

Aus der Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Quantifizierung der Morphologie der Tumorinvasionsfront des Plattenepithelkarzinoms des
Ösophagus mittels der fraktalen Box-Counting-Dimension D_B

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Kevin Ralph Winger

aus Böblingen

Karlsruhe, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 25. Februar 2026

Nachnutzungslizenz: Namensnennung, keine Bearbeitungen (CC-BY-ND-4.0)

Inhaltsverzeichnis

<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	1
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	6
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	8
<u>1 EINLEITUNG UND ZIEL DER DISSERTATION</u>	11
<u>2 LITERATURDISKUSSION</u>	17
2.1 KLINISCHE UND PATHOLOGISCHE KLASSEFICATION VON TUMORGEWEBE - AM BEISPIEL DES PLATTENEPIHELKARZINOMS DES ÖSOPHAGUS	17
2.1.1 GRUNDLAGEN DER KLINISCHEN UND PATHOLOGISCHEN TUMORKLASSEFICATION	17
2.1.2 KLINISCHE UND PATHOLOGISCHE TUMORKLASSEFICATION DES PLATTENEPIHELKARZINOMS DES ÖSOPHAGUS	18
2.2 TUMORBIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DES INVASIVEN WACHSTUMS	24
2.2.1 INVASIVES WACHSTUM – GRUNDLAGE DER TUMORPROGRESSION UND METASTASIERUNG	24
2.2.2 DIE TUMOR-INVASIONSFRONT ALS SPIEGELBILD DES MALIGEN PHÄNOTYPS	31
2.3 GRUNDLAGEN DER FRAKTALEN GEOMETRIE UND DEREN ANWENDUNG IM MEDIZINISCHEN KONTEXT	34
2.3.1 WAS IST DIE FRAKTALE GEOMETRIE?	34
2.3.2 ZUR BENUTZUNG DER TERMINOLOGIE DER FRAKTALEN GEOMETRIE	35
2.3.3 BEGRIFFSDEFINITION FRAKTAL	38
2.3.4 SIND NATÜRLICHE OBJEKTE FRAKTAL?	41
2.3.5 PARAMETER UND METHODEN ZUR BESCHREIBUNG UND VERMESSUNG VON FRAKTALEN	43
2.3.6 DIE FRAKTALE ANALYSE – GRUNDLEGENDER AUFBAU UND ABLAUF	47
2.3.7 ANWENDUNG DER FRAKTALEN GEOMETRIE ZUR HISTOPATHOLOGISCHEN ANALYSE	49
<u>3 MATERIAL UND METHODEN</u>	51
3.1 VORBEMERKUNGEN UND ÜBERBLICK DES VERSUCHSAUFBAUS	51
3.2 GRAFISCHE ÜBERSICHT DES GRUNDLEGENDEN VERSUCHSAUFBAUS	52
3.3 MATERIALIEN FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG UND DIGITALISIERUNG DER PRÄPARATE	53
3.3.1 LABORGERÄTE	53
3.3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	54

3.3.3	REAGENZEN UND LÖSUNGEN.....	55
3.3.4	ANTIKÖRPER.....	58
3.3.5	SOFTWAREPROGRAMME FÜR DIE DIGITALE BILDBEARBEITUNG UND FRAKTALE ANALYSE.....	59
3.4	BESCHREIBUNG HISTOLOGISCHE PROBEN	59
3.5	METHODIK DER MULTIPLEX-IMMUNHISTOCHEMIE UND DIGITALISIERUNG	60
3.5.1	VERFAHRENSPROTOKOLL DER MULTIPLEX-IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG.....	61
3.5.2	DIGITALISIERUNG MIT DEM ZEISS AXIOSCAN Z.1.....	62
3.6	DIGITALE BILDVERARBEITUNG UND FRAKTALE ANALYSE-METHODE	62
3.6.1	BEURTEILUNG UND VORBEREITUNG DER DIGITALEN PRÄPARATE IN QUPATH	62
3.6.2	ERSTE BEARBEITUNG IN IMAGEJ.....	63
3.6.3	ZELLERKENNUNG UND SEPARATION IN CELLPROFILER	64
3.6.4	ENDBEARBEITUNG IN IMAGEJ	66
3.6.5	FRAKTALE ANALYSE MIT DEM IMAGEJ-PLUGIN FRACTAC	66
3.7	STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG MITTELS SPSS UND BESCHREIBUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN AUSWERTUNGSPROTOKOLLE	69
4	<u>ERGEBNISSE.....</u>	73
4.1	DIE FRAKTALE DIMENSION D_B ALS PARAMETER ZUR UNTERSCHIEDUNG VON TUMOR- UND NORMALGEWEBE	73
4.1.1	PIPELINE 1 – PAN-ZYTOKERATIN	73
4.1.2	PIPELINE 2 – E-CADHERIN	76
4.2	DIE FRAKTALE DIMENSION D_B ALS PARAMETER ZUR UNTERSCHIEDUNG DES TUMOR-GRADING	79
4.2.1	PIPELINE 1 – PAN-ZYTOKERATIN	79
4.2.2	PIPELINE 2 – E-CADHERIN	84
4.3	ÜBERLEBENSANALYSE – PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DER FRAKTALEN DIMENSION D_B IM HINBLICK AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN BEIM PLATTENEPITHELKARZINOM DES ÖSOPHAGUS	89
4.3.1	PIPELINE 1 – PAN-ZYTOKERATIN	89
4.3.2	PIPELINE 2 – E-CADHERIN	93
5	<u>DISKUSSION.....</u>	97
5.1	DIGITALE BILDVERARBEITUNG UND FRAKTALE BILD-ANALYSE VON MULTIPLEX-IMMUNFLUORESCENZ- FÄRBUNGEN HISTOLOGISCHER PRÄPARATE ZUR QUANTIFIZIERUNG DER TUMOR-STROMA- BZW. PARENCHYM- STROMA-GRENZE – STÄRKEN UND LIMITATIONEN	97
5.1.1	BIOLOGISCHE REPRÄSENTATIVITÄT UND HISTOLOGISCHE PRÄPARATION	98
5.1.2	EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE EMPIRISCHE MESSUNG DER KÄSTCHENZÄHLDIMENSION D_B UND VORGEHEN ZUR KALIBRIERUNG DER MESSMETHODE	99

5.1.3	SCHWÄCHEN UND LIMITATIONEN DER KÄSTCHENZÄHLMETHODE	102
5.2	DIE FRAKTALE BOX-COUNTING-DIMENSION D_B ALS PARAMETER ZUR DIFFERENZIERUNG VON TUMOR- UND NORMALGEWEBE.....	104
5.3	DIE FRAKTALE BOX-COUNTING-DIMENSION D_B ALS PARAMETER ZUR DIFFERENZIERUNG DER HISTOLOGISCHEN GRADING-KLASSEN	106
5.4	DIE FRAKTALE BOX-COUNTING-DIMENSION D_B ALS PROGNOTISCHER FAKTOR DES GESAMTÜBERLEBENS...	107
5.5	WEITERENTWICKLUNG	109
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	110
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	112
8	<u>ANHANG</u>	128
9	<u>DANKSAGUNG.....</u>	133
10	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</u>	134
11	<u>TABELLARISCHER LEBENSLAUF.....</u>	135

Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
AJCC	American Joint Committee on Cancer
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
CAF	cancer-associated fibroblast
CD	cluster of differentiation
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CK	Zytokeratin
CPS	combined positive score
CT	Computertomografie
cTNM	clinical TNM
CZI	Carl Zeiss Image
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
d. h.	das heißt
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
D _B	Fraktale Box-Counting-Dimension/ Kästchenzähldimension
D _E	Euklidische Dimension
DLA	diffusion limited aggregation

DNA	deoxyribonucleic acid
D ₀	Kapazitätsdimension
D _s	Ähnlichkeitsdimension
D _T	Topologische Dimension
Ed.	Edition
EGF	epidermal growth factor
EMR	endoskopische Mukosaresektion
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
engl.	englisch
et al.	et alii
etc.	et cetera
EZM	extrazelluläre Matrix
FD	fraktale Dimension
ggf.	gegebenenfalls
GR-Nr.1	Gitterraster-Methodik Nummer 1
GR-Nr.2	Gitterraster-Methodik Nummer 2
HCl	Wasserstoffchlorid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	hepatocyte growth factor
HRP	horseradish peroxidase

ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
ID	Identifikation
i. d. R.	in der Regel
IF	Immunfluoreszenz
Ig-CAM	immunoglobulin-like cell-adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
insb.	insbesondere
L	Liter
M	Mol
MAPK	Ras-mitogen-activated-protein-kinase
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
Mg	Magnesium
mIF	Multiplex-Immunfluoreszenz
mIHC	Multiplex-Immunhistochemie
MIT	Massachusetts Institute of Technology
mL	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metallo-Protease
MSI	Mikrosatelliteninstabilität

MTLA	Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
n_DB _{power}	DB _{mean} eines Normalgewebe-TMAs gemessen mit GR-Nr.2.
n_DB _{scaled}	DB _{mean} eines Normalgewebe-TMAs gemessen mit GR-Nr.1
NSCLC	non small cell lung cancer
PBS	phosphate-buffered saline
PD	Privatdozent
PD-L1	programmed cell death protein-1 ligand
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
pH	Potenzial des Wasserstoffs
pTNM	pathological TNM
ROI	region of interest
SE	standard error
sog.	sogenannte/r
TAM	tumor-associated macrophage
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
t_DB _{power}	DB _{mean} eines Tumor-TMAs gemessen mit GR-Nr.2
t_DB _{scaled}	DB _{mean} eines Tumor-TMAs gemessen mit GR-Nr.1
TGF- β	transforming growth factor β

tiff.	Tagged Image File Format
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Tyramide Signal Amplification
Tween20	Polysorbat 20
u. a.	unter anderem
UICC	Union for International Cancer Control
v. Chr.	vor Christus
VEGF-C	Vascular Endothelial Growth Factor C
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hallmarks of Cancer.....	12
Abbildung 2: Makroskopische Klassifikation der Japanese Society for Esophageal Diseases.....	20
Abbildung 3: Unterschiedliche Differenzierungsgrade des Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.....	21
Abbildung 4: Rolle von E-Cadherin bei Tumorinvasion und Metastasierung.....	28
Abbildung 5: Grafische Darstellung der sog. Julia-Menge in verschiedenen Stufen der Vergrößerung (a-d).....	35
Abbildung 6: Flussdiagramm zur Darstellung des grundlegenden Aufbaus der entwickelten Methodik.....	52
Abbildung 7: Darstellung eines Tumor-TMA und isolierte Betrachtung der drei verwendeten IF-Kanäle DAPI (blau), Pan-Zytokeratin (rot), E-Cadherin (gelb).	63
Abbildung 8: Darstellung des grundlegenden Aufbaus der Cellprofiler-Pipeline.	65
Abbildung 9: Optionsmenü des Gitterrasters in FracLac für die Standard Box Counting Analyse.....	68
Abbildung 10: Vom mIF-Präparat zur fraktalen Analyse.....	69
Abbildung 11: Boxplots für die Parameter t_{DB_scaled} , n_{DB_scaled} , t_{DB_power} , n_{DB_power} für das Kollektiv der gepaarten TMA's (N_{E1}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.....	75
Abbildung 12: Boxplots für die Parameter t_{DB_scaled} , n_{DB_scaled} , t_{DB_power} , n_{DB_power} für das Kollektiv der gepaarten TMA's (N_{E1}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.	78
Abbildung 13: Boxplots für den Parameter t_{DB_scaled} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMA's (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin ..	83
Abbildung 14: Boxplots für den Parameter t_{DB_power} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMA's (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. .	83
Abbildung 15: Boxplots für den Parameter t_{DB_scaled} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMA's (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.....	87
Abbildung 16: Boxplots für den Parameter t_{DB_power} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMA's (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.....	88

Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven zur Überlebenszeit des Kollektivs (N_{E2}) in Abhängigkeit der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimension t_{DB_scaled} (obere Grafik) und t_{DB_power} (untere Grafik) für die Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.	92
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven zur Überlebenszeit des Kollektivs (N_{E2}) in Abhängigkeit der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimension t_{DB_scaled} (obere Grafik) und t_{DB_power} (untere Grafik) für die Pipeline 2 – E-Cadherin.	96
Abbildung 19: Visueller Vergleich der IF-Färbung für Pan-Zytokeratin (links) und der generierte binäre Umriss (rechts).....	104
Abbildung 20: Variationen der rekursiven Konstruktion der Koch-Kurve und deren Ähnlichkeitsdimension.....	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stufen und Kriterien des Gradingystems beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.....	21
Tabelle 2: Vergleich der euklidischen und fraktalen Geometrie.....	39
Tabelle 3: Verwendete Geräte für die mIHC und Digitalisierung der Präparate.....	53
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die mIHC.....	55
Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Lösungen für die mIHC mit Lieferanten-Angabe und Bestellnummer.....	57
Tabelle 6: Verwendete Antikörper zur mIF-Färbung mit Lieferanten.....	58
Tabelle 7: Verwendete Antikörper mit Puffern zur Antigenmaskierung sowie Fluorochrome.....	58
Tabelle 8: Verwendete Software mit Angabe der Version und Quelle.....	59
Tabelle 9: Aufstellung der beiden Methodiken zur Berechnung der Gitterraster in FracLac.....	67
Tabelle 10: Deskriptive Statistik der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimensionen für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.....	73
Tabelle 11: Testung auf Normalverteilung für die Parameter t_{DB_scaled}, n_{DB_scaled}, t_{DB_power}, n_{DB_power} für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.....	75
Tabelle 12: Wilcoxon-Rangsummen-Test für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.....	76
Tabelle 13: Deskriptive Statistik der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimensionen für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 2 - E-Cadherin.....	77
Tabelle 14: Testung auf Normalverteilung für die Parameter t_{DB_scaled}, n_{DB_scaled}, t_{DB_power}, n_{DB_power} für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.....	78
Tabelle 15: Wilcoxon-Rangsummen-Test für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 2 - E-Cadherin.....	79
Tabelle 16: Deskriptive Statistik der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimensionen t_{DB_scaled} und t_{DB_power} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.....	80

Tabelle 17: Teststatistik auf Normalverteilung für die Parameter t_{DB_scaled} und t_{DB_power} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.	81
Tabelle 18: Levene-Teststatistik zur Prüfung der Varianzhomogenität der Parameter t_{DB_scaled} und t_{DB_power} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.	81
Tabelle 19: Ränge des Kruskal-Wallis-Test der Parameter t_{DB_scaled} und t_{DB_power} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.	82
Tabelle 20: Teststatistiken des Kruskal-Wallis-Test der Parameter t_{DB_power} und t_{DB_scaled} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.	82
<i>Tabelle 21: Ergebnisse der Post Hoc-Analyse im paarweisen Vergleich der Grading-Klassen für den Parameter t_{DB_scaled} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.</i>	84
Tabelle 22: Ergebnisse der Post Hoc-Analyse zum paarweisen Vergleich der Grading-Klassen für den Parameter t_{DB_power} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.	84
Tabelle 23: Deskriptive Statistik der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimensionen $t_{DB_{scaled}}$ und $t_{DB_{power}}$ für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.	85
Tabelle 24: Teststatistik auf Normalverteilung für die Parameter t_{DB_scaled} und t_{DB_power} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.	85
Tabelle 25: Levene-Teststatistik zur Prüfung der Varianzhomogenität für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.	86
Tabelle 26: Ränge des Kruskal-Wallis-Test der Variablen t_{DB_scaled} und t_{DB_power} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2- E-Cadherin.	86
Tabelle 27: Teststatistiken des Kruskal-Wallis-Test der Parameter t_{DB_power} und t_{DB_scaled} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.	87

Tabelle 28: Ergebnisse der Post Hoc-Analyse im paarweisen Vergleich der Grading-Klassen für den Parameter t_DB_scaled für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.	88
Tabelle 29: Zusammenfassung der Fallverarbeitung nach Klassierung von t_DB_scaled anhand des Medians in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.	89
Tabelle 30: Zusammenfassung der Fallverarbeitung nach Klassierung von t_DB_power anhand des Medians in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.	90
Tabelle 31: Auflistung der mittleren und medianen Überlebenszeiten für t_DB_scaled klassiert anhand des Medians in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.....	90
Tabelle 32: Auflistung der mittleren und medianen Überlebenszeiten für t_DB_power klassiert anhand des Medians in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.....	91
Tabelle 33: Zusammenfassung der Fallverarbeitung nach Klassierung von t_DB_scaled anhand des Medians in der Pipeline 2 – E-Cadherin.	93
Tabelle 34: Zusammenfassung der Fallverarbeitung nach Klassierung von t_DB_power anhand des Medians in der Pipeline 2 – E-Cadherin.	93
Tabelle 35: Auflistung der mittleren und medianen Überlebenszeiten für t_DB_scaled klassiert anhand des Medians in der Pipeline 2 – E-Cadherin.....	94
Tabelle 36: Auflistung der mittleren und medianen Überlebenszeiten für t_DB_power klassiert anhand des Medians in der Pipeline 2 – E-Cadherin.....	94
Tabelle 37: Klinische TNM-Klassifikation des Ösophaguskarzinoms.....	129
Tabelle 38: Plattenepithelkarzinom des Ösophagus - Klinische Stadieneinteilung nach UICC 2018.....	130
Tabelle 39: Prognostische Gruppeneinteilung nach UICC 2018 – Plattenepithelkarzinome des Ösophagus.....	131
Tabelle 40: Häufigkeitsverteilung der klinischen Parameter "Geschlecht", "Grading-Klassen" und "Überlebensstatus" der 179 eingeschlossenen Patienten (N_{E2}).....	131
Tabelle 41: Lagemaße der klinischen Parameter „Alter“ und „Überlebenszeit“.....	132

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Die Entartung einer Körperzelle und die Entwicklung einer unkontrolliert proliferierenden und invasiven Krebserkrankung wird als Onkogenese oder Karzinogenese bezeichnet. Ursache bzw. Grundlage der Onkogenese sind genetische und epigenetische Veränderungen (1, 2). Nach gegenwärtiger Ansicht ist der Ursprung jeder Tumorerkrankung eine einzelne Zelle, welche durch erworbene Mutationen entartet und daraufhin klonal expandiert. Im Zuge der unkontrollierten Proliferation kommt es durch verschiedene Einflussfaktoren einem Teil der Klone zur Akkumulation weiterer Mutationen. Einige davon führen zum Zelltod, manche sind hinderlich für das weitere Wachstum, manche sind neutral und einige, sog. Driver-Mutationen, begünstigen die weitere Proliferation, Invasion und Metastasierung (2).

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte zeigen jedoch, dass es sich bei einem Tumor nicht um die bloße Ansammlung entarteter Zellen handelt. Vielmehr bilden Subpopulationen genetisch und epigenetisch heterogener maligner Zellen im Rahmen der Tumorprogression mit diversen Zelltypen des umgebenden Stromas, dem Tumormikromilieu (engl. tumor microenvironment), eine dynamische gewebeähnliche Organisationseinheit (1, 3). Nach Hanahan und Weinberg (1) kann dieser komplexe Prozess in zehn krebsdefinierende Eigenschaften („Hallmarks of Cancer“, siehe Abbildung 1) unterteilt werden:

1. (Kontinuierliche) Aufrechterhaltung von Proliferationssignalen
2. Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren
3. Apoptoseresistenz
4. Befähigung zur unbegrenzten Zellteilung
5. Induktion der Angiogenese
6. Fähigkeit des invasiven Wachstums und der Metastasierung
7. Immunevasion
8. Deregulation des Energiestoffwechsels
9. Generieren einer tumorfördernden Entzündungsreaktion bzw. des Tumormikromilieus
10. Genom-Instabilität und erhöhte Mutationsrate

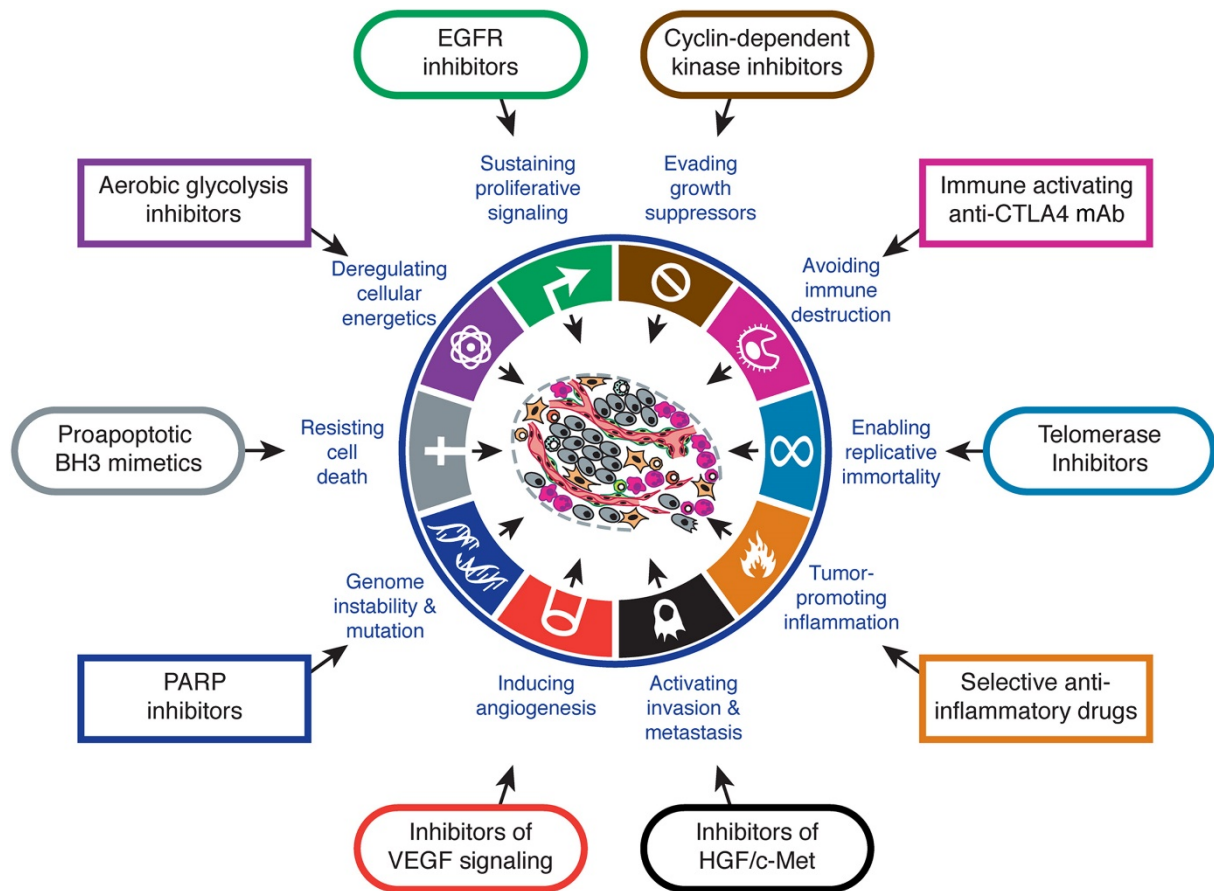


Abbildung 1: Hallmarks of Cancer. Dargestellt sind die nach Hanahan und Weinberg definierten zehn tumordefinierenden Eigenschaften (innerer Kreis). Zudem wird exemplarisch jeweils eine therapeutische Substanzklasse dargestellt, deren Wirkmechanismus in den entsprechenden Hallmark eingreift. Quelle: unverändert übernommen aus (1).

Die letzten beiden genannten Eigenschaften befördern zudem die Entwicklung der ersten acht. Der Erwerb dieser Eigenschaften vollzieht sich nicht simultan, sondern über einen gewissen Zeitraum in multiplen Schritten (1). Als histomorphologisches Korrelat kommt es zu einer zunehmenden Entdifferenzierung, d. h. einer zunehmenden morphologischen und funktionellen Entfernung der Tumorzellen von ihrem Ursprungsgewebe (4) und diese entwickeln ein zunehmend invasiveres Wachstum (1, 2). So verläuft der Prozess der Tumorgenese beispielsweise beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus i. d. R. schrittweise von einer basalen Hyperplasie über eine chronische Ösophagitis und eine zunehmende schwerere Dysplasie zum Karzinom (5). Diese Komplexität und Heterogenität abzubilden ist wohl eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin dieses Jahrhunderts und ist zugleich Chance zur Optimierung bekannter - und Entwicklung neuer diagnostischer und

therapeutischer Konzepte. Dies ist vor dem Hintergrund der global weiterhin stark steigenden Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen (6) auch dringend notwendig.

Das Ösophaguskarzinom bildet hierbei keine Ausnahme. Es ist die achthäufigste maligne solide Neoplasie weltweit (7). Das Plattenepithelkarzinom ist dabei global betrachtet der dominierende histologische Subtyp (8) und erreicht im sog. „Asian Esophageal Cancer Belt“ eine altersstandardisierte Inzidenz von mehr als 11,1 pro 100.000 Personen (9). In Abhängigkeit des histologischen Subtyps und des Tumorstadiums stehen diverse multimodale Therapiekonzepte in Form von lokal ablativen Verfahren, endoskopischer und chirurgischer Resektion, Strahlentherapie, klassischer Chemotherapie und seit einigen Jahren mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab (10) und Ipilimumab (11) neue Therapeutika zur Verfügung (12). Trotz dieses breiten Spektrums an therapeutischen Optionen ist das Ösophaguskarzinom aufgrund der vermehrten Diagnosestellung in fortgeschrittenen Stadien und diversen assoziierten Komorbiditäten die sechstödlichste Krebserkrankung weltweit (13). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur 15 - 25 %, wobei frühe Stadien miteingerechnet sind (7, 13). Besonders in fortgeschrittenen und metastasierten Stadien ist die Auswahl und Wirkung der Therapeutika begrenzt und dadurch die Prognose stark limitiert (5, 12, 14).

Zur effektiven Therapieplanung und Prognoseeinschätzung einer soliden Neoplasie gehören bereits heute eine Vielzahl an tumor- bzw. patientenspezifischen Informationen. Relevant sind hierfür die Tumorart (Typing), die Tumorausbreitung (Staging), der Malignitätsgrad (Grading), sowie optional je nach Tumorentität auch laborchemische, molekularpathologische und patientenspezifische Parameter (15). Während bei Staging und Typing international einheitliche Standards über die Tumorentitäten hinweg existieren, gilt dies für das histopathologische Grading nicht (4). Trotz der Identifikation des Tumorausbreitungsmusters und der begleitenden Entzündungsreaktion als unabhängige prognoserelevante Gradingfaktoren des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus bereits Ende des letzten Jahrhunderts (16, 17), sind diese in der aktuell gültigen WHO-Klassifikation nicht etabliert (18, 19) und der klinische Stellenwert des histopathologischen Grading reduziert (4). Dies begründet sich weiterhin in einer ausgeprägten Interobservervariabilität bei Gewichtung der Grading-Kriterien (17), technischer und praktischer Hürden bei der Standardisierung und Erfassung mikroskopischer Befunde sowie der geringeren Relevanz des Grading bei fortgeschrittenen Tumorstadien (4).

Ein bisher wenig beachteter Aspekt ist die Frage, ob sich irreguläre biologische Strukturen, wie das Muster der Tumordinvasion, mit den herkömmlichen Methodiken des histopathologischen Grading und typischen Längenmaßen in ihrer Komplexität der morphologischen Merkmale ausreichend abbilden lassen oder ob Aspekte der Tumorbiologie, da sie für die menschliche Kognition schwer zu erfassen sind, übersehen werden (20, 21). Die Biologie hat keine streng geometrische Struktur. Je nach angelegtem Größenmaßstab verändern sich Detail und gemessene Größe (22). Hinzu kommen Phänomene wie die Wiederholung ähnlicher Muster auf verschiedenen Größenskalen, welche auch Skalierungsselbstähnlichkeit genannt wird (20). Um die Interobservervariabilität und fehlende Standardisierung für schwer zu erfassende biologische Strukturen, wie das Muster der Tumordinvasion, zu reduzieren, benötigt es objektive metrische Parameter. Die nicht-euklidische Geometrie in Form der fraktalen Geometrie könnte als zusätzliches Instrument dienen, um eine alternative, möglicherweise objektivere Analyse morphologischer Strukturen zu ermöglichen (20). Die fraktale Geometrie verwendet hierbei skalunabhängige Maße der Komplexität wie die fraktale Dimension (FD) (22). Die Idee mittels fraktaler Geometrie eine objektive und automatisierte histopathologische Analyse zu entwickeln ist dabei nicht neu. Obwohl innerhalb der letzten 30 Jahre zahlreiche Abhandlungen zur fraktalen Detektion und Klassifikation verschiedener histopathologischer Strukturen bei Tumoren publiziert worden sind (20, 23-27), gab es bei der Implementierung klinisch relevanter Methodiken wenig Fortschritt. Dabei konnte bereits bei Tumorentitäten wie dem invasiven duktalem Mammakarzinom ein Zusammenhang zwischen hohen Werten der FD und einem reduziertem Gesamtüberleben (28) oder dem Fernmetastasierungsrisiko (29) nachgewiesen werden.

Mit Aufkommen und Etablierung der Multiplex Immunhistochemie (mIHC) zur simultanen und spezifischen Detektion multipler zellulärer Biomarker und einer Steigerung der digitalen Rechenleistung der letzten Jahrzehnte könnten die Methoden der fraktalen Geometrie nun weitaus gezielter und im umfangreicheren Maß genutzt werden. Bisher finden sich zur Kombination von mIHC und fraktaler Geometrie zur histopathologischen Untersuchung von Tumoren in der wissenschaftlichen Literatur jedoch kaum Studien (30).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine auf open-source Software basierende Methodik zur digitalen Musterextraktion, Bildverarbeitung und anschließender fraktalen Analyse relevanter pathologischer Strukturen aus digitalisierten Multiplex-Immunfluoreszenz(mIF)-Präparaten von Tumor- und Normalgewebe entwickelt.

Das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus wurde als geeignetes Forschungsobjekt aus zwei Gründen gewählt: Erstens zeigt es ein typisches Spektrum von hoch differenzierten bis gering differenzierten Tumoren mit ausgeprägter Tumorinvasionsfront (18). Zweitens spielen molekularpathologische Untersuchungen für Diagnostik und, mit Ausnahme der MSI-Analyse und dem PD-L1/CPS-Status als prädiktive Marker, auch für die Therapie in der klinischen Praxis bisher keine relevante Rolle. Etablierte molekulare Prognosefaktoren fehlen (12, 31). Die Entdeckung, objektive Erfassung und Etablierung neuer Marker, welche eine Risikostratifizierung ermöglichen, die Prognose oder ein Therapieansprechen zuverlässig vorhersagen oder sogar therapeutische Optionen bieten, ist daher von großer Wichtigkeit. Als zu analysierende Struktur wurde die Tumorinvasionsfront ausgewählt. Beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus als prognostisch relevanter (16), jedoch kaum quantifizierbarer Gradingfaktor identifiziert, ist invasives Wachstum als erster Schritt der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung anzusehen (1, 32).

Ziel dieser Arbeit ist daher die Quantifizierung der Morphologie der Tumorinvasionsfront des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus als Korrelat des invasiven Tumorwachstums mittels der fraktalen Box-Counting-Dimension (D_B) auf Basis der Bio-Marker Pan-Zytokeratin und E-Cadherin im mittels mIHC-gefärbten Präparat. Dieses Vorgehen ist beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus neu und zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit in der wissenschaftlichen Literatur nicht beschrieben.

Als Studien-Gewebeproben wurden insgesamt 344 TMAs („tissue micro arrays“) mit zugehörigen klinischen Datensätzen des Unternehmens TissueArray.Com LLC verwendet. Diese enthielten entweder Tumorgewebe von Plattenepithelkarzinomen oder Normalgewebe des Ösophagus des Menschen. Es wurde eine 4-fach-IF-Färbung etabliert, um relevante Marker der Invasivität von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus abzubilden (Epithelial-neoplastisches Kompartiment, Pan-Zytokeratin; Zellkohäsivität, E-Cadherin; Hypoxie, Carboanhydrase IX; Zellkerne, DAPI). Nach Digitalisierung mithilfe eines Slide-Scanners und Definition einer Region of Interest (ROI) im Programm QuPath (Version 0.2.0-m5, www.qupath.github.io), wurde die ROI mittels ImageJ (www.imagej.nih.gov/ij/index.de) in die 4 farbkodierten Kanäle aufgeteilt und die Bilddateien in Cellprofiler (Version 3.1.9, www.cellprofiler.org) exportiert. In Cellprofiler wurden, mithilfe einer selbst-konstruierten Pipeline, die Nuklei und Zellmembranen auf Basis der Marker DAPI und Pan-Zytokeratin sowie E-Cadherin detektiert und Stromazellen von Tumorzellen bzw. Epithelzellen separiert. Auf

Grundlage dieser Einzelzell-basierten Detektion kann im Programm „ImageJ“ die Tumor-Stroma- bzw. Epithel-Stroma-Grenze erfasst und in das ImageJ-Plugin „FracLac“ exportiert werden. Das Plugin „FracLac“ misst die fraktale Dimension des importierten Bildes und liefert einen numerischen Wert als Ergebnisparameter.

Im Rahmen dieser Quantifizierung soll darüber hinaus die klinische Anwendbarkeit der fraktalen Box-Counting-Dimension D_B als Diskriminierungs- und Prognosefaktor geprüft werden, indem folgende drei Fragestellungen beantwortet werden.

- 1) Ist eine Differenzierung von Tumorgewebe und Normalgewebe anhand der fraktalen Box-Counting Dimension D_B auf Basis der Morphologie der Tumor-Stroma-Grenze bzw. der Epithel-Stroma-Grenze möglich?
- 2) Ist eine Differenzierung der histologischen Grading-Klassen nach WHO mittels der fraktalen Box-Counting Dimension D_B auf Basis der Morphologie der Tumor-Stroma-Grenze beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus möglich?
- 3) Ist die fraktale Box-Counting Dimension D_B auf Basis der Morphologie der Tumor-Stroma-Grenze beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ein prognostischer Parameter des Gesamtüberlebens?

Zuletzt soll diese Forschungsarbeit das interessante Forschungs- und Anwendungsfeld der fraktalen Geometrie einem breiten wissenschaftlichen Publikum vorstellen und deren Einsatz in der medizinischen Forschung anregen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Klinische und pathologische Klassifikation von Tumorgewebe - am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus

2.1.1 Grundlagen der klinischen und pathologischen Tumorklassifikation

Aufgrund des breiten Spektrums klinischer Ausprägung müssen zur korrekten Klassifikation, Therapieplanung und Prognoseabschätzung von Tumorerkrankungen zahlreiche Charakteristika erfasst und eingeordnet werden. Zu diesen essentiellen Faktoren gehört einerseits die histologische Bestimmung der Tumorart (Typing), die Tumorausbreitung im Organismus (Staging), sowie, falls therapeutisch und prognostisch relevant, das histopathologische Grading und weitere laborchemische, molekularpathologische und patientenspezifische Parameter (4, 15).

Die Klassifikation einer soliden Neoplasie erfolgt nach der international anerkannten TNM-Klassifikation der „Union for International Cancer Control“ (UICC). Das TNM-System ist dabei ein Dualsystem, in dem zwischen einer klinischen (prätherapeutischen) Klassifikation (cTNM) und einer pathologischen Klassifikation (pTNM) unterschieden wird (15).

Die TNM-Klassifikation umfasst für den jeweiligen Tumortyp nach histologischem Nachweis die Tumorlokalisierung, sowie die anatomische Ausbreitung des Tumorgeschehens in den drei Kategorien T, N und M, wobei jede Kategorie mehrere Unterkategorien ausweist. Diese definiert die lokale Ausbreitung und Invasivität des Primärtumors, das Fehlen oder Vorhandensein und das Ausmaß des lymphatischen Befalls sowie das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasierung (15). Je nach Befund der T-, N- und M-Kategorien ergeben sich für jede Tumorentität 12 – 40 unterschiedliche Tumorgruppen. Aussagekräftige statistische Analysen für diese vielen Gruppen sind aber nur dort möglich, wo ausreichend große Patientenkollektive verfügbar sind. Um eine Orientierung auch an kleineren Patientenkohorten zu ermöglichen, hat man TNM-Gruppen mit ähnlicher Prognose zu Stadien zusammengefasst. Diese mit römischen Ziffern (ggf. mit Zusatz großer Buchstaben) bezeichneten Stadien berücksichtigen T, N und M bzw. pT, pN und pM, und bei vielen Tumorentitäten auch noch weitere Faktoren wie beispielsweise das histopathologische Grading, Alter, Residualtumor nach Resektion, Tumormarker oder molekulare

Prognosefaktoren. Die Zusammenfassung zu Stadiengruppen mit gleichen Prognosen dient hierbei zur besseren Vergleichbarkeit in Studien und zur Therapieplanung (15).

Zur Tumorklassifikation ist die Gewinnung von verwertbarem Gewebe zur histopathologischen Aufarbeitung daher i. d. R. obligat. Dies erfolgt entweder im Rahmen einer primär oder sekundär therapeutischen Resektion oder mittels diagnostisch invasiver Eingriffe bspw. einer sonographisch oder CT-graphisch gesteuerten Punktion. Das Ziel der histopathologischen Aufarbeitung ist dabei in erster Linie die Bestimmung des histologischen Typs, also der Vergleich mit dem Ursprungsgewebe und damit die Bestimmung der Tumorentität (15). Dieser Prozess wird „Typing“ genannt und ist essentiell, um eine sinnvolle und evidenzbasierte tumorspezifische Therapie einzuleiten. Weitere wichtige Fragestellungen sind die Größe bzw. Infiltrationstiefe des Primärtumors und die Anzahl an betroffenen Lymphknoten (15).

An nachgeordneter Stelle steht dann das histopathologische Grading. In dieser mikroskopischen Untersuchung wird der Differenzierungs- bzw. Malignitätsgrad des Gewebes erfasst. Im Rahmen dieser Untersuchung wird je nach Tumortyp versucht die tumorbiologischen Eigenschaften Differenzierung, Proliferation, Nekroseneigung, Invasivität und die Fähigkeit zur Metastasierung anhand histologischer Kriterien zu erfassen (4). Eingeteilt wird das Gewebe in drei bis vier Differenzierungsgrade.

Für einige Tumorentitäten wie bspw. das Prostatakarzinom werden andere Gradingssysteme verwendet (15). Je nach Tumorentität fließen dabei unterschiedliche Kriterien in die histomorphologische Bewertung ein und werden durch immunhistochemische und molekularpathologische Untersuchungen ergänzt (4). Die nachrangige Stellung des Grading ist der Tatsache geschuldet, dass dieses meist nur in einzelnen UICC-Stadien der jeweiligen Tumorentität prognostisch und prädiktiv aussagekräftig und damit therapierelevant ist (17).

2.1.2 Klinische und pathologische Tumorklassifikation des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus

International anerkannter Standard zur klinischen Klassifikation des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus ist die TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 37 und 38 im Anhang) der UICC (8, 15). Daneben existiert noch die Klassifikation der „Japan Esophageal Society“, welche, außer in der Frage der Lymphknotenmetastasierung, nur marginal von den Aussagen der TNM-Klassifikation abweicht, jedoch einige weitere Aspekte wie bspw. Längenmaße des Tumors,

die Art des makroskopischen Wachstums sowie die Infiltrationstiefe detaillierter beschreibt (33). Zudem gibt die Klassifikation ein standardisiertes Schema vor, welche die Reihenfolge der klinisch-pathologische Beschreibung definiert: Tumorlokalisierung, Ausdehnung und Länge des Primärtumors, makroskopischer Tumortyp, histologischer Typ, Tiefe der Tumorinvasion, Lymphknotenmetastasen, Organmetastasierung und Stadium (33).

2.1.2.1 Tumorlokalisierung:

Plattenepithelkarzinome können im gesamten Bereich der Speiseröhre auftreten. Bevorzugt kommen sie im mittleren Drittel vor (31). Eine Einteilung nach Lokalisation in der Speiseröhre erfolgt anhand der ICD-O (15):

- C15.0: zervikaler Ösophagus
- C15.3: oberer thorakaler Abschnitt des intrathorakalen Ösophagus
- C15.4: mittlerer thorakaler Abschnitt des intrathorakalen Ösophagus
- C15.5: unterer thorakaler Abschnitt des intrathorakalen Ösophagus
- C16.0: ösophagogastraler Übergang

Im Bereich des gastroösophagealen Übergangs gilt, dass Tumoren, deren Zentrum den Abstand von zwei Zentimeter zum Übergang nicht überschreitet und in den Ösophagus hineinreichen, nach der Klassifikation der Ösophaguskarzinome eingeordnet werden (15). Die japanische Klassifikation ist hierzu deckungsgleich (33).

2.1.2.2 Makroskopische Tumortypen

Die „Japanese Society for Esophageal Diseases“ beschreibt im Gegensatz zur TNM-Klassifikation zusätzlich fünf makroskopische Tumortypen, welche nach Infiltrationstiefe und Wachstumsmuster in Mukosa und Submukosa eingeteilt werden (siehe Abbildung 2). Die makroskopischen Tumortypen haben hohe Relevanz in der Therapieplanung der endoskopischen Mukosaresektion (EMR), da Tumoren mit polypösen und exkavierten Wachstum häufig bereits die Submukosa infiltriert haben und damit nicht für die EMR in Frage kommen (33).

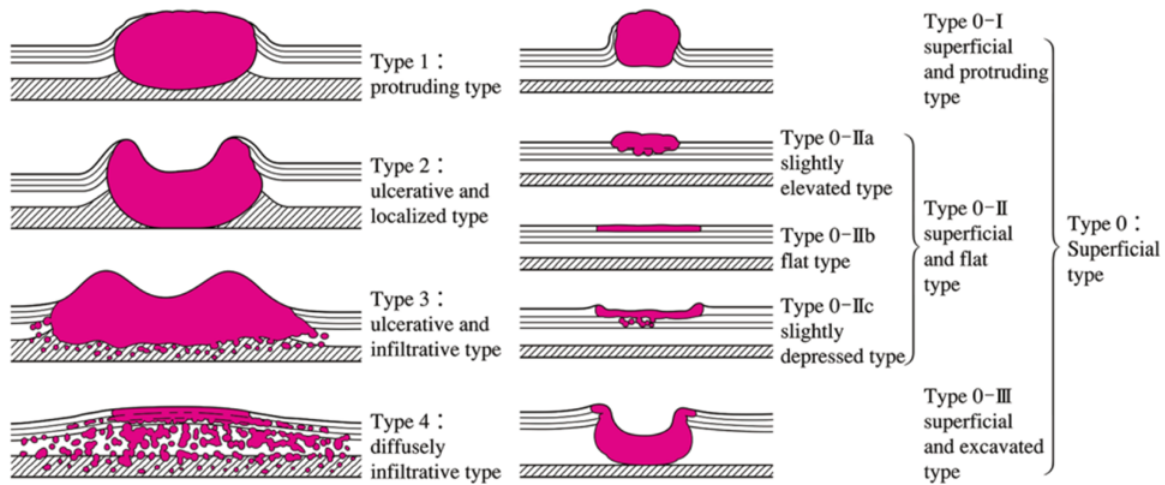


Abbildung 2: Makroskopische Klassifikation der Japanese Society for Esophageal Diseases. Es erfolgt eine Einteilung hinsichtlich infiltrativem Wachstumsmuster (links) und Infiltrationstiefe (rechts). Quelle: unverändert übernommen aus (33).

2.1.2.3 Histologische Klassifikation

Beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus handelt es sich um einen malignen Tumor epithelialen Ursprungs (19). Histologisch charakteristisch sind keratinozytenähnliche Zellen mit Interzellularbrücken und/oder Verhornung (34). Insgesamt zeigt das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus einen hohen Grad an histologischer Variabilität mit dem Vorkommen von sowohl gut differenzierten bis undifferenzierten Tumoren (siehe Abbildung 3). Zudem wird diese Heterogenität noch durch histologische Varianten wie das verruköse Karzinom, das Spindelzellkarzinom, das basaloide Plattenepithelkarzinom und das adenosquamöse Karzinom weiter gesteigert (18). Im Allgemeinen geht die Entdifferenzierung mit einer Abnahme des Zytoplasmas und der Verhornung und einer Zunahme der mitotischen Aktivität und der nukleären Polymorphie einher (18).

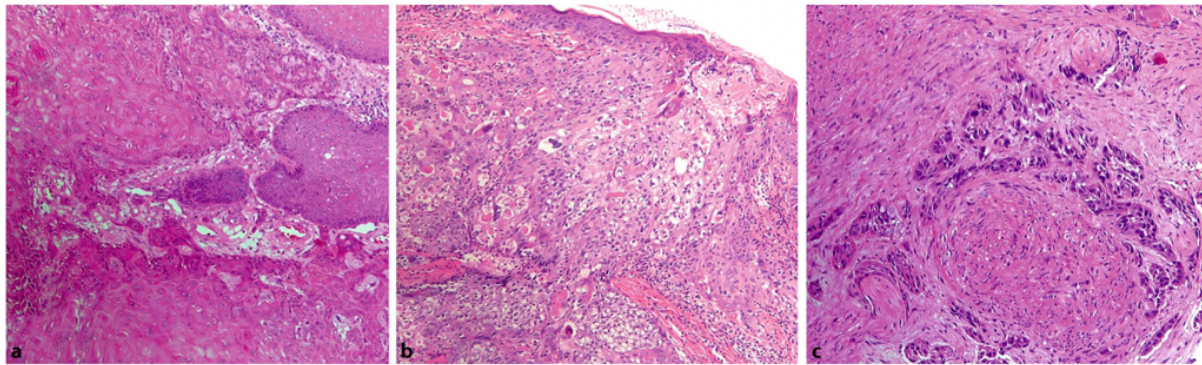


Abbildung 3: Unterschiedliche Differenzierungsgrade des Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. a Gut differenziertes Plattenepithelkarzinom. b Mäßig differenziertes Plattenepithelkarzinom. c Gering differenziertes Plattenepithelkarzinom. Quelle: unverändert übernommen aus (17).

Miteinbezogen in das histopathologische Grading werden das Ausmaß der Kernpolymorphie, die mitotische Aktivität und die Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe und das Vorhandensein von Verhornung (18, 19, 34). Die Einteilung erfolgt in ein Gradingssystem mit drei Graden:

Grading-stufe	Differenzierung	Ähnlichkeit zum Ursprungsepithel (Zelluläre Atypien)	Verhornung (Hornperlen)	Vorherrschende Zellpopulation	Interzellularbrücken
G1	Gut differenziert	hoch	häufig	Reif plattenepithelial	deutlich
G2	Moderat differenziert	Noch erkennbar	Selten oder keine	Mehr basaloid, teilweise rein plattenepithelial	Fokal erhalten
G3	Schlecht differenziert	Kaum erkennbar	keine	undifferenziert	Selten oder keine

Tabelle 1: Stufen und Kriterien des Gradingystems beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Quelle: modifiziert nach (35), <https://www.pathologen-luebeck.de/klassifikationen-2/#ui-id-5>, Stand 31.03.2024).

In der wissenschaftlichen Diskussion steht ein Gradingssystem mit Einteilung in zwei Graden, da die Differenzierung zwischen Grad 1 und 2 häufig einer hohen Interobservervariabilität unterliegt (34). Immunhistochemisch bedeutsam ist die Expression von Zytokeratin-Varianten (insbesondere CK 14 und 16), welche ubiquitär in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

vorhanden sind (18, 36). Ein Expressionsverlust einiger Zytokeratin-Varianten ist mit zunehmender Entdifferenzierung häufig und betrifft in erster Linie die Zytokeratin-Varianten CK 4 und CK 13. Zudem ist eine Neoexpression nicht-typischer Varianten möglich, insbesondere CK8/CK18 und CK 10 (37).

2.1.2.4 Prognostische Stadieneinteilung und Prognosefaktoren

Prognosebestimmend sind die drei Kategorien der TNM-Klassifikation (34). In der T-Kategorie ist hierbei nicht die Tumorgröße, sondern die Infiltrationstiefe bzw. Infiltration, der den Verdauungstrakt aufbauenden Gewebeschichten und des Mediastinums ausschlaggebend (8, 38, 39). In der N-Kategorie sind die Anzahl der regionalen Lymphknotenmetastasen (38, 39) sowie in der M-Kategorie das Fehlen bzw. Vorliegen von Fernmetastasen Prognosefaktoren. Das histopathologische Grading und die Lokalisation spielen eine nachgeordnete Rolle (34). Mehrere Studien zeigten, dass das aktuelle histologische Grading-System der WHO, angewendet auf das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, keinen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt (16, 40), auch wenn es in die Prognosegruppeneinteilung der UICC (siehe Tabelle 39 im Anhang) miteinfließt und als klinische Entscheidungshilfe in frühen Stadien dient.

Weitere unabhängige tumor-bezogene Prognosefaktoren sind nur sehr begrenzt vorhanden. Hierzu zählen die Invasionstiefe der Lymphknotenmetastasen sowie die Invasion von Lymphgefäßen und Venen (15, 41). Weiterhin ist nach EMR oder chirurgischer Resektion der pathologische Residualtumorstatus prognoserelevant (18, 31). Trotz vielfältiger experimenteller Ansätze und teilweise vielversprechenden Ergebnissen zu zahlreichen serologischen oder molekularpathologischen Biomarkern wie beispielweise p53-Protein (42), Cyclin D1 (43), E-Cadherin (43), und Relaxin-2 (44) ist bisher keine Etablierung in der klinischen Praxis gelungen. Damit haben Biomarker bisher keinen Stellenwert in klinischer Diagnostik, Therapie, Prädiktion und Prognose des Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (12, 18, 31, 45).

2.1.2.5 Stärken und Schwächen der bisherigen Klassifikation

Die etablierten Klassifikationen des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus ermöglichen es, Ausbreitungsmuster und Grad der Ausbreitung der Erkrankung objektiv und global vergleichbar zu erfassen, Stadiengruppen zu definieren und Patienten evidenzbasiert und

vergleichbar zu behandeln. Da experimentelle Ansätze mit serologischen und molekularpathologischen Biomarkern bisher erfolglos blieben, ist es essenziell, die bereits etablierte Diagnostik der Staging-Untersuchungen und der histopathologischen Begutachtung weiter zu verbessern.

Mehrere Studien zeigten zudem, dass das histologische Grading-System der WHO, angewendet auf das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, keinen unabhängigen prognostischen Faktor (16, 40) darstellt, auch wenn es in die Prognosegruppeneinteilung der UICC miteinfließt und als klinische Entscheidungshilfe in frühen Stadien dient (31). Ein wesentlicher Aspekt ist hierbei, dass das histologische Grading, insbesondere für Tumore des Gastrointestinaltraktes, einer Interobservervariabilität unterliegt, d. h. verschiedene beurteilende Pathologen können zu variierenden Einschätzungen des Grading kommen. Dies begründet sich in der Tatsache, dass Grading-relevante Faktoren subjektiv unterschiedlich gewichtet werden können (17).

Ein weiterer relevanter Punkt ist die Aussagekraft der Grading-relevanten Faktoren selbst. Die Untersuchung von Sarbia et al. (16) bewertete die histologischen Parameter „Grad der Verhornung“, „Nukleären Polymorphismus“, „Tumor-Invasionsfront“, „Mitotischer Aktivität“ und „Entzündungsreaktion“ bezüglich ihrer prognostischen Aussagekraft. Hier zeigte sich, dass nur die Parameter „Entzündungsreaktion“ und „Tumor-Invasionsfront“ unabhängige prognostische Faktoren im Hinblick für das Gesamt-Überleben waren.

Diese histologischen Parameter sind kein Teil des aktuell histologischen Grading-Systems der WHO (16, 17). In der Klassifikation der „Japan Esophageal Society“ ist eine genauere Beschreibung der Infiltrationstiefe und eine grobe Beschreibung des Wachstumsverhaltens in einen expansiven, in einen infiltrativen und in einen intermediären Typ (33) enthalten, jedoch ohne eine prognostische oder therapeutische Konsequenz. Da die tumorassoziierte Entzündungsreaktion und die Beschaffenheit der Tumor-Invasionsfront nicht ausreichend einbezogen werden, scheinen wesentliche Aspekte der Tumorbiologie nicht ausreichend repräsentiert zu sein.

2.2 Tumorbiologische Grundlagen des invasiven Wachstums

2.2.1 Invasives Wachstum – Grundlage der Tumorprogression und Metastasierung

Der Prozess des invasiven Wachstums ist eine grundlegende Eigenschaft von Krebs (1). Als invasives Wachstum gilt dabei die lokale Gewebeeinfiltration in Form der Überwindung natürlicher Barrieren des Gewebes, wie der Basalmembran, und das Eindringen in das interstitielle Stroma (46). Damit ist invasives Wachstum wiederum als erster Schritt im sequenziellen Prozess der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung bei Karzinomen anzusehen, da die Überwindung der Basalmembran und die Infiltration von intaktem Stroma Voraussetzungen sind, um Anschluss an das Blut- und Lymphgefäßsystem zu bekommen (1, 32, 47).

Allgemein anerkannt ist, dass Tumore mit abnehmender Differenzierung zu invasiverem Wachstum neigen, was sich auch prognostisch äußert. „Eine gesunde Epithelzelle migriert in der Regel nicht und wächst nicht invasiv“ (1). Hierfür finden sich zahlreiche Belege in der Literatur. Beispielsweise demonstriert die Studie von Ono et al. (48), dass beim kolorektalen Karzinom ein Verlust des epithelialen Wachstumsmusters und lokaler Entdifferenzierung der Tumorzellen an der Tumorinvasionsfront mit einer erhöhten Rate an Lebermetastasen einhergeht. Auch beim Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass beim Vorliegen einer multi- oder oligometastasierten Erkrankung sowohl im Primarius, als auch in den Metastasen in der Mehrzahl schlecht differenzierte Tumorzellen vorhanden sind (49, 50).

Jedoch erlangen nicht alle malignen Zellen eines Tumors dabei die Fähigkeiten des invasiven Wachstums (51). Schon 1985 zeigten Gabbert et al. (52), dass Zellen im Tumorzentrum einen höheren Grad der Differenzierung aufweisen als jene Zellen in der Tumorperipherie. Besonders starke Zeichen der Entdifferenzierung zeigten sich an der Grenze des Tumors zum umgebenden Stroma, der sog. Tumorinvasionsfront. Gemutmaßt wurde, ob Tumorzellen mit dieser Strukturveränderung sogar aktiv an die Tumorinvasionsfront einwandern (52). Fidler und Hart (53) zeigten dabei die Bedeutung der genetischen Heterogenität der Subpopulationen des Primärtumors für das Invasions- und Metastasierungsverhalten auf. Invasives Tumorstadium ist dabei gekennzeichnet durch verschiedene Migrationsprozesse von Einzelzellen und Zellverbänden, welches sich in Veränderungen des zellulären Phänotyps (54) sowie der Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen der Tumorzellen und Zellen

des Tumormikromilieus äußert (46, 47). Im Folgenden werden die einzelnen relevanten Aspekte des invasiven Tumorwachstums genauer erläutert.

2.2.1.1 Formen der zellulären Migration in Tumoren

Grundsätzlich unterscheidet man in der Zellmigration, ob sich Zellen einzeln oder im Verband fortbewegen. Hierbei gibt es zahlreichen Unterformen. Für die Migration von malignen Zellen ist vorrangig die mesenchymale Migration als Einzelzelle und die kollektive Migration als Zellverband relevant (46). Dabei ist zelluläre Migration nur durch multiple wechselseitige Interaktionen der migrierenden Zelle bzw. Zellverbands und den umgebenden Zellen sowie der extrazellulären Matrix (EZM) möglich (55). Bei der Migration von malignen Zellen zeigen sich viele Parallelen zur Embryo- und Organogenese sowie zur Geweberegeneration (47, 56). In Tumoren werden häufig sowohl Formen der Einzelzellmigration und kollektiven Migration simultan beobachtet. Hierbei zeigen Lymphome und die meisten mesenchymalen Tumoren eher Einzelzellmigration, während bei den überwiegenden Karzinomen kollektive Invasion vorherrscht. (46). Darüber hinaus scheint das Stadium der Differenzierung eine wichtige Rolle zu spielen. Mit fortschreitender Entdifferenzierung neigen Tumoren eher zur singulären Migration (57).

Einzelzellmigration - Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

Ein gewisser Anteil der malignen Zellen durchläuft im Rahmen der Invasion und Metastasierung einen Prozess, welcher der sog. Epithelialen-mesenchymalen Transition ähnelt. Die EMT einer epithelialen Zelle bewirkt eine Änderung des zellulären Phänotyps hin zu einem mesenchymalen (58). Dieser grundsätzlich physiologische Prozess, welcher eine große Rolle in der Embryogenese (59) und Wundheilung (60) spielt, wird in abgewandelter Form auch bei vielen Krebsarten beobachtet (58, 61). Dies äußert sich in einem Verlust der Zellpolarität, einer Reduktion der Zell-Zell-Verbindungen mit verminderter Expression und Funktion wichtiger Zelladhäsionsproteine, einer Neustrukturierung des Zytoskeletts mit verminderter Keratin- und erhöhter Vimentin-Expression sowie der erhöhten Resistenz gegenüber der Apoptose (58, 62-64). Weiterhin werden Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) zur Auflösung der EZM und zur Überwindung der Basalmembran vermehrt exprimiert (63, 65).

Auch wenn noch unklar ist, in welchem Maße Tumorzellen eine vollständige EMT durchlaufen oder nur EMT-ähnliche Prozesse auftreten (58, 62), ist der Sinn des Prozesses der Gleiche:

Durch die Änderung des zellulären Phänotyps wird eine Zunahme an zellulärer Mobilität erreicht, die es einer (Tumor-)zelle ermöglicht ihren Zellverband als Einzelzelle zu verlassen, die EZM zu durchqueren und eine Migration der Zellen in ein anderes Gewebe zu beginnen (58, 63). Im Falle einer Tumorzelle ist dies der erste Schritt zur Bildung von Mikrometastasen (32). In Kombination mit dem umgekehrten Prozess, der mesenchymalen-epithelialen Transition (MET), wird die Wiedererlangung des Proliferationspotenzials einer Epithelzelle (58) und damit die Ausbildung von Makrometastasen sowie die Bildung von Tumor-Stammzellen möglich (66). Damit wird das Potenzial zur unbegrenzten Dissemination und Immortalität erlangt (67). Somit lässt sich zusammenfassen, dass EMT und MET essentielle Prozesse zur Invasion, Metastasierung und unbegrenzten Proliferation zu sein scheinen (58, 66).

Zur EMT-Induktion sind multiple Stimuli beschrieben, darunter beispielweise die vermehrte Sekretion des Wachstumsfaktors TGF- β (transforming growth factor β) (68, 69), die verminderte Expression und Funktion von E-Cadherinen (66, 70), die Daueraktivierung verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen wie c-Met oder MAPK (Ras-mitogen-activated-protein-kinase) (57, 66) oder Hypoxie (71, 72).

Kollektive Zellmigration

Im Unterschied zur mesenchymalen Migration migrieren die Zellen als Zellverband. Hierzu scheint die Aufrechterhaltung von Zellverbindungen wie Gap Junctions und die zelluläre Kommunikation unter den migrierenden Zellen essenziell zu sein (73-75). Zudem sind eine kollektive Ausrichtung der Zellpolarität, die abgestimmte Koordination der Zytoskelett-Aktivität, Interaktionen mit Stromazellen und weitreichendere EZM-Veränderungen nötig (47). Die Migrationsmuster können als strang-, finger- oder clusterförmig beschrieben werden (46, 76). In diesen Migrationsverbänden ist die phänotypische Ausprägung und möglicherweise auch die genetische Ausstattung heterogen. Sehr mobile Tumorzellen, sog. „forerunner cells“, an der Spitze der Formation sorgen für die Degradation der EZM und bauen mittels Pseudopodien und anderen Zellausstülpungen Zug auf. Die restlichen Zellen folgen passiv (77). Auch bei der kollektiven Migration spielen EMT-ähnliche Prozesse, wenn auch in geringerer Ausprägung, eine wichtige Rolle (47). Die kollektive Invasion wird histopathologisch und in vitro (75, 77, 78) bei den meisten Karzinomen beobachtet. Experimentelle in-vivo-Modelle bestätigten dies (79).

2.2.1.2 Plastizität des Zytoskeletts

Zellmigration erfordert temporär grundlegende Veränderungen der Zellstruktur. Die Anpassungen im Zytoskelett, insbesondere durch veränderte Aktin-Myosin-Interaktion, führt im Zusammenspiel mit einer lokalen EZM-Veränderung und Interaktion mit anderen Zellen zu einem sich wiederholenden Zyklus aus Protraktion, Anhaftung und Retraktion zur Fortbewegung des Zellkörpers (55, 80, 81). Darüber hinaus sind bei migrierenden Zellen, zur Anheftung und Interaktion mit Stromazellen und der EZM sowie zur Degradation der EZM, Ausstülpungen des Zellkörpers wie bspw. Lamellipodien, Filopodien und Pseudopodien beschrieben (82, 83).

2.2.1.3 Veränderte Zell-Zell-Interaktion und Expression von Zelladhäsionsproteinen

Zell-Zell-Verbindungen wie Adherens Junctions sind grundlegende Bestandteile der Gewebearchitektur und bestehen vorwiegend aus Zelladhäsionsmolekülen. Zu den wichtigsten Vertretern der Zelladhäsionsmolekülen gehören die Cadherine, Ig-CAMs (immunoglobulin-like cell-adhesion molecules) und der Hyaluron-Rezeptor CD 44. Die Hauptrolle spielen hierbei Cadherine, welche gemeinsam mit Cateninen und anderen Molekülen den zytoplasmatischen Zell-Adhäsions-Komplex bilden (58, 84). Dies wird umso relevanter, da Zelladhäsionsmoleküle über den zytoplasmatischen Zell-Adhäsions-Komplex direkt die intrazelluläre Signaltransduktion modulieren (85, 86). Je nach Zellart und deren Funktion werden verschiedene Cadherine exprimiert und bestimmen so deren Interaktion mit anderen Zellen und auch deren Mobilität (1).

Eine Reduktion oder ein Verlust der E-Cadherin-Funktion geht in In-vitro- und In-vivo-Versuchen mit einer vermehrten Dissemination von Epithelzellen in die Umgebung einher (87, 88) und ist als ein Stimulus für die Einleitung EMT-ähnlicher Prozesse und der Einzelzellmigration beschrieben (47, 57, 58). Darüber hinaus korreliert eine zunehmende Invasivität und Neigung zur (frühen) Metastasierung bei vielen Tumorentitäten mit einer verminderten Funktion und Expression von E-Cadherinen (54, 61, 70, 88-91) (siehe Abbildung 4), auch wenn dieser Zusammenhang nicht in allen Studien nachgewiesen werden kann (92, 93).

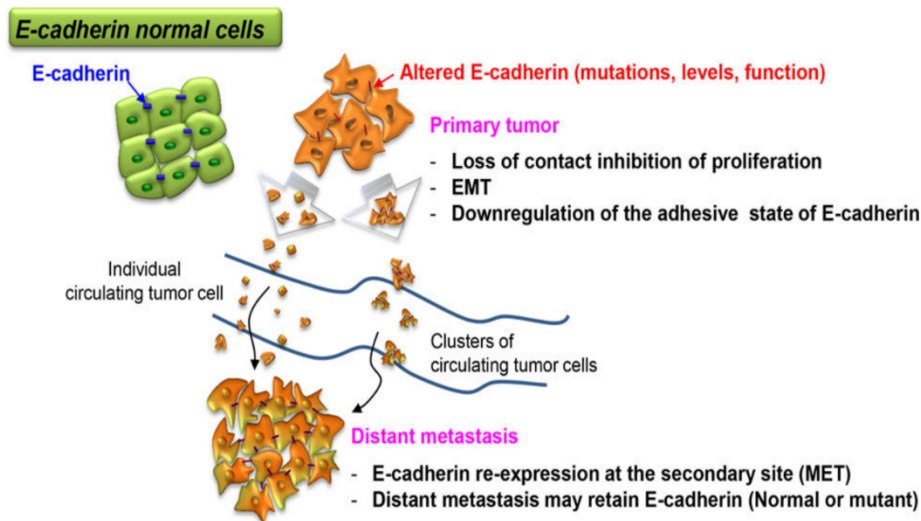


Abbildung 4: Rolle von E-Cadherin bei Tumorinvasion und Metastasierung. Quelle: unverändert übernommen aus (94).

Im Gegensatz dazu scheint eine erhöhte Funktion und Expression von mesenchymalen Cadherinen wie N-Cadherinen und Cadherin-11 mit einer erhöhten Tumorzellmotilität zu korrelieren (95). N-Cadherine spielen eine wichtige Rolle in der Fortbewegung und Interaktion mesenchymaler Zellen und migrierender Einzelzellen (85). Weiterhin scheint es bei der kollektiven Migration von Tumorzellen zu einer verstärkten Expression von Ig-CAMs zu kommen (96). Die Veränderung der E-Cadherin-Expression und -Funktion sowie anderer Zelladhäsionsproteine kann als eine Grundvoraussetzung für invasives Tumorwachstum und Metastasierung angesehen werden (54, 61, 86, 91).

2.2.1.4 Zell-Matrix-Interaktion und Restrukturierung der extrazellulären Matrix

Die EZM bildet das Grundgerüst zur Zellinteraktion und -bewegung sowie zur Gewebestabilität und -organisation. Zudem bildet sie ein Hindernis für migrierende Zellen aller Art (55, 97). Um die Migration maligner Zellen durch die EZM zu ermöglichen, sind erstens grundlegende Veränderungen der Zell-Matrix-Interaktion notwendig und zweitens muss eine Umstrukturierung der EZM mit dem Ziel der Zellpermeabilität sowohl für Einzelzellen als auch für Zellcluster erfolgen (1, 98).

Bedeutsam zur Zell-Matrix-Interaktion ist die Zell-Rezeptorgruppe der Integrine (78, 99, 100). Integrine weisen Bindungsstellen für die meisten Zellmatrixkomponenten wie Kollagene,

Fibronektin, Laminin und Vitronektin auf (101) und sind andererseits mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden (47). Darüber hinaus besitzen einige Vertreter proteolytische Aktivität (98). Diverse Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Integrin-Expression und Art und Geschwindigkeit der Zellbewegung auf (78, 99, 102). Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass in Anwesenheit von Integrin-Antagonisten die Migration, insbesondere von Zellverbänden, deutlich erschwert zu sein scheint (78).

Zur Strukturveränderung der EZM müssen Tumorzellen selbst proteolytische Enzyme produzieren oder die proteolytische Aktivität anderer Zellen nutzen (1). Die Hauptbestandteile der EZM sind Kollagene, Laminine, Fibronektin und Vitronektin (103), welche durch MMPs, Adamalysin-verwandte Membranproteinasen, Serin-Proteasen und Cathepsine proteolytisch gespalten werden können (82, 98, 104). Die Gruppe der MMPs spielt hierbei, sowohl in der Migration von Einzelzellen als auch von Zellverbänden als kollagenspaltendes Enzym, eine führende Rolle (75, 105). Ziel ist es im ersten Schritt die Basalmembran zu durchbrechen und anschließend Lücken in der EZM zu schaffen (1, 82). Die erhöhte Expression und Aktivität von Matrix-degenerierenden Enzymen, insbesondere MMPs, ist bei verschiedenen Tumorentitäten in zahlreichen Studien beschrieben (98, 103). Beispielsweise zeigten die Untersuchungen von Van der Stappen et al. (106) beim kolorektalen Karzinom eine inverse Korrelation zwischen proteolytischer Aktivität und histologischer Differenzierung. Eine Unterscheidung zwischen Neoplasien der Lunge und Normalgewebe anhand der MMP Stome Lysin 3 gelang dagegen Urbanski et al. (107).

Weiterhin können Eigenschaften der EZM, wie Kollagengehalt oder Faserdurchmesser moduliert werden, um die Durchlässigkeit, Stabilität und Orientierung der EZM den eigenen Migrationsbedürfnissen anzupassen (55). Friedl et al. (47, 108) beschreiben hier Restrukturierungsprozesse wie die Spaltung und Reorganisation von Kollagen in röhrenartige Strukturen oder die laterale Ablagerung von Basalmembrankomponenten zur Bildung von Lücken und Migrationskorridoren für maligne Zellen.

2.2.1.5 Der Tumor als komplexes Gewebe - Beteiligung des Tumormikromilieus

Ein invasiv wachsender Phänotyp kann nicht durch die genetischen Veränderungen der malignen Zellen allein erklärt werden. Die Einleitung EMT- und MET-ähnlicher Prozesse, die Restrukturierung der extrazellulären Matrix und weitere Invasion- und Metastasierungsfördernde Prozesse sind nur in Interaktion mit dem umgebenden Stroma möglich (1, 63, 67).

Als Folge bildet sich ein komplexes Gewebe, bestehend aus malignen Zellen, mit heterogener genetischer und epigenetischer Ausstattung, sowie aus Stroma-Zellen, welche zum Tumormikromilieu (engl. „tumor microenvironment“) oder Tumor-Stroma werden und aktiv zur Tumorentstehung wie -progression beitragen (1, 109, 110). Das Tumormikromilieu wird in die zellulären und nicht-zellulären Kompartimente unterteilt. Zur zellulären Komponente gehören Zellen des Gefäßsystems, Zellen der Immunabwehr und Zellen mit (unter-)stützendem Charakter wie Fibroblasten und Adipozyten (109). Zur nicht-zellulären Komponente hingegen gehören die Bestandteile der EZM sowie Moleküle zur Zell-Zellinteraktion und verschiedener Stoffwechselprozesse wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Metabolite (109). Tumorstroma, auch reaktives Stroma genannt, unterscheidet sich in vielfältiger Weise von normalem Stroma. Besonders hervorzuheben ist hierbei die erhöhte Anzahl aktivierter Fibroblasten und Makrophagen, Kapillaren sowie einer erhöhten Expression der EZM-Bestandteile Kollagen Typ I, Fibrin und Fibronectin (3, 111, 112).

Betrachtet man die zellulären Komponenten des Tumorstromas, spielen insbesondere Subpopulationen der Fibroblasten, sog. „cancer-associated fibroblasts“ (CAFs) (3), und der Makrophagen, sog. „tumor-associated macrophages“ (TAMs) (113), eine zentrale Rolle. Fibroblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs, welche weder den Zellen des Gefäßsystems, des Immunsystems noch des Epithels zugeordnet werden können (3). Ihre physiologischen Aufgaben sind vielfältig (114). Hierzu zählen u. a. die Synthese, Reorganisation und Degradation von Bestandteilen der EZM, die Regulation der epithelialen Differenzierung sowie die Modulation und Gewährleistung von Zellmigration, bspw. von Immunzellen, durch die EZM (115, 116). Die Subpopulation der CAFs weisen dabei hohe Ähnlichkeiten mit aktivierten Fibroblasten oder Myofibroblasten auf, welche in Verbindung mit Wundheilungsprozessen auftreten (117, 118). Belege, dass die Subpopulation der CAFs die Tumorprogression im Vergleich zu normalen Fibroblasten in vivo fördern können (3), zeigte beispielsweise die Studie von Orimo et al. (119). So können CAFs große Mengen an MMPs synthetisieren (101), welche zur Degradation der Basalmembran dienen sowie die Migration durch die EZM ermöglichen. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei den sog. „forerunner cells“, welche die kollektive Migration innerhalb eines Tumor-Zellclusters initiieren und deren Migration durch die EZM steuern, um CAFs handelt (120). Zudem ist die parakrine Sekretion von potenziell tumorproliferationsfördernden Molekülen wie TGF- β oder HGF (engl. hepatocyte growth factor), die Modulation der Immunantwort über Chemokine und

Interleukine, sowie der Aufbau einer potenziell progressionsfördernder EZM mittels gesteigerter Synthese von Kollagentyp I und III und die De-novo-Synthese von Tenascin C beschrieben (3).

TAMs tragen ebenso nachweislich zur Tumorprogression bei (113, 121). Zusätzlich zur Fähigkeit der Degradation und Re-Organisation der EZM und Basalmembran mittels verschiedener Proteasen (122) zählen die Förderung von Migration von Tumorzellen innerhalb des Primarius und in das Gefäßlumen mittels Chemotaxis (123), die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF) (124) sowie die Stimulation der Angiogenese (125). Belegt wird dies eindrucksvoll durch die Übersichtsarbeit von Bingle et al. (126) oder Studien von Ryder et al. (127) und Chen et al. (128), welche eine inverse Korrelation zwischen einer erhöhten Dichte von TAMs im Primarius und einer reduzierten Prognose von verschiedenen Tumorentitäten in einer Mehrzahl der Studien aufzeigt. Zusammenfassend ist für maligne Zellen sowohl zum lokalen invasiven Wachstum, als auch zur Ausbildung von Mikro- und später von Makrometastasen die Interaktion mit dem Tumorstroma essentiell (32).

2.2.2 Die Tumor-Invasionsfront als Spiegelbild des malignen Phänotyps

Wie dargelegt, handelt es sich beim invasiven Tumorwachstum um verschiedene Migrationsprozesse von Einzelzellen und Zellverbänden in engem Zusammenspiel mit Tumorstroma und EZM. Besonders umfangreich untersucht ist die Tumorinvasion beim kolorektalen Karzinom. Immunhistochemische Analysen zeigten hier die Tumorinvasion von Tumorzellverbänden und Einzelzellen mit verminderter Expression von E-Cadherin in verschiedenen Bereichen des Tumors. Betrachtet man Lokalisationen innerhalb des Primarius und den Bereich der sog. Tumorinvasionsfront, also den Bereich, in welchem die Tumorzellen auf gesundes Gewebe stoßen und dieses durch invasives Wachstum zerstören und verdrängen, werden lokale morphologische Unterschiede des Tumorwachstums deutlich. Während im Zentrum des Tumors die malignen Zellen eine Polarität und Wachstum in Form von tubulären Strukturen aufweisen, wird an der Tumorinvasionsfront eine Einzelzelldissemination mit Auflösung der tubulären Strukturen beschrieben (129).

Ein hierbei zu nennendes Phänomen ist das sog. „tumor budding“. Beim tumor budding handelt es sich um das Auftreten von einzelnen malignen Zellen oder Clustern von weniger

als fünf Zellen außerhalb der Hauptmasse des Tumors. Damit ist tumor budding ein starker Hinweis auf eine vermehrte Einzelzellmigration an der Tumordinvasionsfront und damit auf einen invasiven Phänotyp der Tumorzellen (130). Während das Ausmaß des tumor budding beim kolorektalen Adenokarzinom als ungünstiger prognostischer Marker identifiziert und als optionales Merkmal in der pathologischen Begutachtung etabliert ist (131), bestätigte sich auch bei zahlreichen anderen Krebsentitäten, insbesondere jenen des Gastrointestinaltraktes, eine Korrelation mit dem Auftreten einer Lymphknotenmetastasierung und einer reduzierten Prognose (132-135). So konnte in einer Studie von Kim et al. bei höheren Graden des tumor budding eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten von Infiltration der Lymphgefäße, höherem Tumorgrad und Lymphknotenmetastasierung festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation mit dem progressionsfreien Überleben nach R0-Resektion ohne signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben (136).

Man kann also, wie bereits durch Gabbert et al. (52) beschrieben, einen unterschiedlichen Phänotyp der Tumorzellen und Wachstumsmuster je nach Lokalisation im Primarius annehmen. Parallel hierzu zeigen sich eine regional differente Verteilung von Zellen des Tumorstromas. Beispielhaft lassen sich die Untersuchungen von Lin et al. (137) und Wyckoff et al. (123) nennen, welche eine lokale Häufung von TAMs in Bereichen aufgelöster Basalmembranen beschreiben.

2.2.2.1 Tumorinvasionsfront – Morphologisches Charakteristikum des Tumorwachstums

Eines der Grundprinzipien der Biologie ist die Struktur-Funktionsbeziehung. Dies bedeutet, dass die Struktur einer biologischen Einheit eine bestimmte Art der Funktion erst ermöglicht bzw. sich eine bestimmte Struktureinheit als Grundlage der Funktionsausübung erst bildet (138). Die morphologische Beschaffenheit der Tumorinvasionsfront von epithelialen Tumoren stellt ebenso eine Strukturveränderung als Folge der funktionellen Veränderungen der Tumorzellen, des Tumorstromas und des umliegenden Gewebes im Rahmen der malignen Erkrankung dar. Diese invasiven Wachstumsmuster präsentieren sich in der histomorphologischen Ausprägung unterschiedlich. Grob unterscheiden kann man strang- oder fingerförmige Invasionsmuster gegenüber cluster- oder nestförmigen. Während erstere in Kontakt mit dem Primärtumor bleiben und lokal invasiv wachsen, zeigen zweitere eine disseminierte Ausbreitung (46). Kollektive Tumorinvasionsmuster präsentieren sich häufig deutlich weniger organisiert als ihr physiologisches Korrelat (47). Es drängt sich daher die

Erkenntnis auf, dass die morphologische Beschaffenheit der Tumorinvasionsfront, welche Ergebnis, der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebene funktionellen und strukturellen Veränderungen von Migrationsverhalten, Zellkontaktexpression, Beschaffenheit der EZM und Tumorstroma sind, ein Charakteristikum des Tumorwachstums ist.

2.2.2.2 Die Tumor-Invasionsfront – objektivierbar durch morphometrische Parameter?

Wie bereits in Kapitel 2.1.2.5 dargelegt, zeigte die Studie von Sarbia et al. die prognostische Relevanz der Tumor-Invasionsfront des Plattenepithelkarzinom des Ösophagus im Hinblick auf das Gesamtüberleben auf (16). Auch bei anderen Tumor-Entitäten konnte dieser Zusammenhang ermittelt werden (139, 140).

Insgesamt sind Studien zur Untersuchung der Morphologie der Tumor-Invasionsfront in der wissenschaftlichen Literatur nur in begrenzter Menge vorhanden. Bisherige Untersuchungen quantifizieren dabei die Morphologie der Tumorinvasionsfront am histologischen Schnitt entweder mittels visueller Betrachtung und Differenzierung durch menschliche Observer (139, 140), mittels metrischer Maße (141) oder mittels Bio-Marker (142-144). So unterteilen beispielsweise Einkenel et al. (141) die Morphologie der Tumorinvasionsfront in einer Studie von histologischen Schnitten mit Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung des Plattenepithelkarzinom des Zervix in abgeschlossene, fingerförmige und diffuse Invasionsmuster und quantifizieren diese auf Grundlage des Durchmessers und der Pixeldichte. Andere Ansätze sind Organoid- oder Flüssigkeits-Kulturen (145).

Auffallend ist, dass in den meisten Studien die Auswertung und Differenzierung durch einen menschlichen Pathologen erfolgt und damit die Interobserver-Variabilität ein nicht zu unterschätzender Störfaktor ist (17, 141) oder sogar therapie relevant sein kann (146). Eine Vermessung der Tumorinvasionsfront mit subjektiven Methoden der visuellen Begutachtung durch einen menschlichen Observer scheint daher nicht zielführend. Weiterhin handelt es sich bei der Tumorinvasionsfront um eine chaotische, begrenzt lineare Abgrenzung, welche mit Methoden der euklidischen Geometrie schwer zu erfassen scheint.

Die weitreichenden Veränderungen von Struktur und Form von Einzelzellen und Zellverbänden im Rahmen einer Neoplasie sind derart komplex, dass konventionelle euklidische Maße wie die Länge oder das Volumen diese vermutlich unzureichend abbilden (23, 138). Gleiches ist für Morphologie der Tumorinvasionsfront anzunehmen. So ist die

Ausdehnung eines Tumors oder dessen Größe zwar ein wichtiger Parameter, welcher jedoch möglicherweise wesentliche Aspekte des Tumorwachstums nicht berücksichtigt (23).

Um die Morphologie der Tumorinvasionsfront zu quantifizieren, sind daher alternative Vermessungsmethoden zu erwägen. Ein mögliches Werkzeug hierfür könnte die fraktale Geometrie als nicht-euklidische Metrik sein.

2.3 Grundlagen der fraktalen Geometrie und deren Anwendung im medizinischen Kontext

2.3.1 Was ist die fraktale Geometrie?

Bei der fraktalen Geometrie handelt es sich um einen neu entstandenen Zweig der Mathematik des 20. Jahrhunderts, der sich mit der Untersuchung und Beschreibung von irregulären und chaotischen Mengen und Objekten wie bspw. der Julia-Menge beschäftigt (siehe Abbildung 5). Sie steht im Kontrast zur klassischen (euklidischen) Geometrie der typischen geometrischen Strukturen, deren Methoden nicht zur Quantifizierung dieser irregulären Mengen und Objekte geeignet sind (22), und ist nicht an definierte Messskalen gebunden (147). Damit ist sie nach Barnsley (148) zur Simulation physikalischer Strukturen und Prozesse weit besser geeignet als euklidische Maße. Anwendung findet die fraktale Geometrie bereits seit Ende des 20. Jahrhunderts in den meisten Disziplinen der Naturwissenschaften (149).

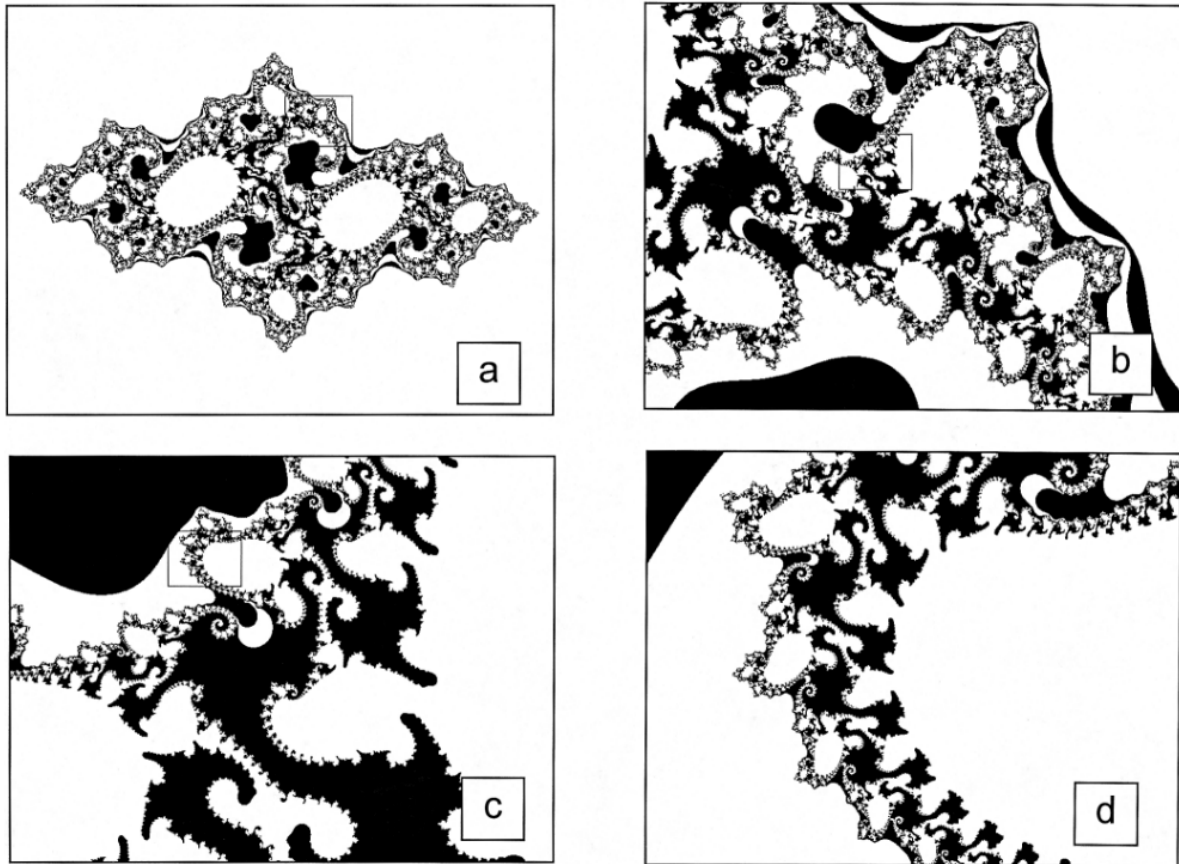


Abbildung 5: Grafische Darstellung der sog. Julia-Menge in verschiedenen Stufen der Vergrößerung (a-d). Gut zu erkennen ist die gleichbleibende Komplexität und Selbstähnlichkeit auch bei weiter zunehmender Vergrößerung. Bei der Julia-Menge, nicht jedoch dessen grafischer Darstellung handelt es sich um ein echtes Fraktal. Quelle: unverändert übernommen aus (20).

2.3.2 Zur Benutzung der Terminologie der fraktalen Geometrie

Die Anwendung der fraktalen Geometrie erfordert die Kenntnis bestimmter mathematischer Begriffe, Definitionen und Zusammenhänge. Nach Meinung von Jelinek et al. (150) werden viele Begriffe aus dem Kasus der fraktalen Geometrie wie „Selbstähnlichkeit“, „raumfüllend“ und „fraktale Dimension“ in der Literatur divergent bzw. falsch gebraucht. Sie appellieren, dass die Linguistik der fraktalen Mathematik zum Gebrauch klar verstanden werden muss und auch anderen verständlich und präzise erklärt werden muss, um fachgebietsübergreifend angewandt zu werden. Zudem herrsche teilweise bei Definitionen und Beschreibungen von grundlegenden Begrifflichkeiten und Zusammenhängen kein wissenschaftlicher Konsens. Dies zeigt sich allein in der Tatsache, dass bis heute keine allumfassende mathematische Definition des Begriffes Fraktals erstellt werden konnte. Bei der Anwendung von Grundlagen

und Methoden der fraktalen Mathematik in fachfremden Disziplinen, wie beispielsweise der Medizin, führt dies häufig zum falschen Gebrauch von Begriffen und der falschen Interpretation der Ergebnisse.

Um der oben genannten Problematik Rechnung zu tragen, wird im folgenden Teil ein besonderes Augenmerk auf die möglichst genaue Abgrenzung und Einordnung der einzelnen Begriffe gelegt. Weiterhin werden im Voraus bereits einige elementare Begriffe der Mathematik in Kürze definiert und erklärt. Die folgenden Definitionen stellen dabei keine mathematisch vollständigen und erschöpfenden Definitionen dar, sondern beschränken sich auf jene Aspekte, welche zum Verständnis der Theorie und Anwendung der Methoden dieser Arbeit für einen vorrangig medizinisch gebildeten Leserkreis benötigt werden.

2.3.2.1 Menge und mathematisches Objekt

Bei dem Begriff der „Menge“ handelt es sich um einen der elementarsten Begriffe der Mathematik, welcher als Ausgangspunkt vielfältiger gedanklicher Konstrukte der Mathematik dient. Der Begriff ist mannigfaltig und wird je nach Einsatz in der Mathematik eher beschrieben als definiert. Die grundlegenden Überlegungen zu diesem Begriff gehen auf Mathematiker wie Georg Cantor, Richard Dedekind und Felix Hausdorff zurück. Für die Beschreibung und Definition wurden zahlreiche Texte und Lehrbücher verfasst. Die kurze Ausführung in dieser Arbeit beruht, sofern nicht anders gekennzeichnet, auf den Büchern des deutschen Mathematikers Oliver Dreiser (151, 152).

Eine Menge ist ein intuitives mathematisches Konstrukt, welches eine Gesamtheit umfasst, die wiederum verschiedene mathematische Elemente enthält. Bei diesen mathematischen Elementen, auch mathematische Objekte genannt, kann es sich um verschiedene Arten von Zahlen (natürliche Zahlen, ganze Zahlen, rationale Zahlen und irrationale Zahlen), aber auch um andere Objekte handeln. Dieser Zusammenhang ist jedoch ambivalent. Da sich Mengen aus den bestehenden Elementen definieren, sind auch Mengen selbst Elemente. Nach dem Extensionalitätsprinzip sind zwei Mengen gleich, wenn sie dieselben Elemente enthalten. Man erkennt, dass diese Begriffe Teile der grundlegenden Ebene der Mathematik bilden, sodass sie sich gegenseitig definieren, um eine Arbeitsbasis zu schaffen. Jedes Fraktal oder auch jede digitale Abbildung eines Fraktals, sowie digitale Abbildungen von natürlichen Objekten, können letztendlich auch als Menge beschrieben werden.

Für diese Arbeit ist insbesondere die Unterscheidung von regulären und irregulären Mengen wichtig. Beispiele für reguläre Mengen sind die Formen der klassischen Geometrie, wie die Ränder von Kreisen oder Ellipsen, auch glatte Kurven genannt. Sie sind eher zusammenhängend. Irreguläre Mengen hingegen sind unzusammenhängend und „kurvenfrei“. Zudem besitzen irreguläre Mengen eine Dimension, welche keine natürliche Zahl ist. Mischbilder dieser Gegensätze der Mengen sind möglich (153).

2.3.2.2 Allgemeiner Dimensionsbegriff und spezifische Dimensionsbegriffe

Zum allgemeinen Dimensionsbegriff:

Der Begriff „Dimension“ sorgt in der Mathematik seit Jahrhunderten für Kontroversen und es wurden eine Vielzahl an verschiedenen Dimensionsbegriffen für grundlegend unterschiedliche Sachverhalte und Probleme der Mathematik eingeführt. Prinzipiell ist die Dimension ein Maß, welches ausdrückt wie viel Raum eine Menge ausfüllt (153). Jedoch sind Falconer (153) und Mandelbrot (22) auch der Ansicht, dass die Dimension einer Menge auf verschiedene Art und Weise definiert werden kann und diese stärker oder weniger stark zutreffen können. Dies ist relevant, da erstens nicht jeder Dimensionsbegriff auf alle vorhandenen bzw. möglichen Mengen und Objekte angewandt werden kann und zweitens eine Anwendung verschiedener Dimensionsbegriffe auf dieselbe zu untersuchende Menge abweichende Ergebnisse liefern kann. Die Konsequenz hieraus ist die konsistente und korrekte Benutzung sowie Verwendung der verschiedenen Dimensionsbegriffe.

Euklidische Dimension D_E und Topologische Dimension D_T :

Bei der euklidischen Dimension D_E handelt es sich um den intuitiven Dimensionsbegriff der klassischen Geometrie, welchen der griechische Mathematiker Euklid von Alexandria um 300 v. Chr. definiert hat. Sie beschreibt den Zustand eines Objektes im Raum. Hierbei hat ein Punkt eine Dimension des Wertes null, eine Linie eine Dimension des Wertes eins, eine Fläche eine Dimension des Wertes zwei und ein Volumen die Dimension des Wertes drei. Sie kann nur positive ganzzahlige Werte annehmen (22, 154). Die Weiterentwicklung der euklidischen Dimension durch Mathematiker wie Poincare, Brouwer und Lebesgue führte zur topologischen Dimension D_T (22). Im euklidischen Raum gilt: $D_E = D_T$ (155). Euklidische und topologische Dimension entsprechen sich also.

Hausdorff-Besicovitch-Dimension oder fraktale Dimension D

Bei der Hausdorff-(Besicovitch)-Dimension handelt es sich um ein Maß, welches Mengen definiert, indem es diese mit einem anderen Maß überdeckt. In diesem Fall mit dem sog. Hausdorff-Maß. Mandelbrot (22) bezeichnete die Hausdorff-(Besicovitch)-Dimension auch als fraktale Dimension D und sie ist essentiell für die Definition eines Fraktals durch Mandelbrot (22). Sie kann sowohl ganzzahlige als auch nicht-ganzzahlige Werte annehmen. Dieser Dimensionsbegriff beschreibt, wie sich die Detailgenauigkeit oder Komplexität eines Objektes bei einer Veränderung der Größenskala verhält und ist damit ein Maß, welches sich zur Quantifizierung von Komplexität und der Selbstähnlichkeit von Formen und Strukturen eignet (23). Die mathematische Erklärung und Beweisführung würden im Zuge dieser Arbeit zu weit gehen und ist für die Anwendung der empirischen Messung nicht nötig, da sie zwar für beliebige Mengen zu definieren ist, die Berechnung der Hausdorff-Dimension aber selbst für einfache Mengen mathematisch sehr kompliziert ist. Sie eignet sich daher nicht für die empirische Vermessung von Fraktalen und Nicht-Fraktalen (153), bildet jedoch die Grundlage für alle fraktalen Dimensionen, welche zur empirischen Vermessung von natürlichen physikalischen Objekten verwendet werden können (156). Spezielle Formen der fraktalen Dimension sind beispielsweise die Ähnlichkeitsdimension D_s oder die Kästchenzähldimension D_B auch Box-Counting-Dimension genannt (156).

2.3.3 Begriffsdefinition Fraktal

Der Begriff „Fraktal“ wurde erstmals in den Siebzigerjahren des 20. Jahrhunderts durch den Mathematiker Benoit Mandelbrot eingeführt. Mandelbrot (22) benennt damit eine sehr heterogene Gruppe von Mengen und mathematischen Objekten, welche im Kontrast zur klassischen Euklidischen Mathematik stehen bzw. sich durch diese, meist aufgrund ihrer Komplexität und Irregularität, nicht ausreichend beschreiben oder untersuchen lassen.

	Euklidisch	Fraktal
Ursprung	Traditionell (Alter > 2000 Jahre)	Modern (Alter < 100 Jahre)
Größen und Maße	Auf Grundlage von charakteristischen Größen und Skalen	Keine bestimmte Größe oder Skalierung
Approximation von Objekten	Menschengefertigte Objekte	Natürliche Formen und Muster
Mathematische Konstruktion	Durch Formeln	Durch (rekursive) Algorithmen

Tabelle 2: Vergleich der euklidischen und fraktalen Geometrie. Quelle: in Anlehnung an (149).

Je nachdem, ob man den Begriff „Fraktal“ streng oder weniger streng definiert, kann man jedoch grundlegend verschiedene Mengen, Objekte oder Phänomene unter der Definition miteinschließen. Die streng gefasste Definition nach Mandelbrot (22) definiert ein Fraktal als Menge, deren Hausdorff-Besicovitch-Dimension D die topologische Dimension D_T übersteigt. Es gilt also $D > D_T$. Ein Fraktal hat also im Gegensatz zu euklidischen Körpern, für welche $D = D_T$ gilt, eine Differenz der Werte dieser Dimensionen. Mandelbrot bezeichnet die Dimension D nach Hausdorff-Besicovitch hierbei auch als eine fraktale Dimension (22). In Worte gefasst bedeutet dies, dass die Dimension D bei Fraktalen größer als deren reguläre geometrische Dimension D_T ist, während bei Nicht-Fraktalen (bspw. einfache geometrische Formen wie ein Dreieck oder ein Quadrat) D und D_T genau gleich groß sind. Dimensionen von Nicht-Fraktalen stimmen also überein und sind damit dimensional konkordante Mengen. Fraktale hingegen sind dimensional diskordant (22). Die Tatsache, dass die Dimension D bei Fraktalen meist keine ganze Zahl, sondern einen Bruch annimmt, hat auch zu deren Namen geführt. Fraktal kommt vom lateinischen Verb „frangere“, was mit „zerbrechen“ übersetzt werden kann (22).

An dieser Stelle ist jedoch erwähnenswert, dass Mandelbrot (22) selbst nicht zufrieden mit der Definition war, da sie bestimmte Mengen, welche eindeutig als Fraktale angesehen werden, ausschließt. Da jedoch keine andere bisher vorgeschlagene Definition diesen Nachteil beseitigt (153), existiert bisher keine formal exakte Definition des mathematischen Begriffs „Fraktal“. Dieser Missstand hat zu einer Unschärfe in der Begriffsbenutzung und zur Entwicklung zahlreicher Modelle und Konzepte geführt, welche versuchen den Begriff zu

konkretisieren oder abzugrenzen (22). Nach Ansicht von Falconer (153) ist die genaue Definition des Begriffs des Fraktals nicht zielführend. Stattdessen sollte man es als Konzept verstehen, das gewisse Objekte und Mengen beschreibt, die bestimmte Eigenschaften aufweisen. In diesem Kontext verweist Falconer insbesondere auf folgende Eigenschaften, welche ein Fraktal besitzt:

1. Vorhandensein einer sog. Feinstruktur. Dies bedeutet, dass sich auch bei unbegrenzter Vergrößerung der Struktur noch Einzelheiten und Details zeigen.
2. Eine durch Methoden der klassischen Geometrie nicht messbare Irregularität der Struktur, sowohl in Teilbereichen als auch in der Gesamtheit der Struktur.
3. Eine Form der Selbstähnlichkeit, welche sowohl streng, annähernd als auch statistisch sein kann.
4. Den von Mandelbrot beschriebenen Zusammenhang, dass die fraktale Dimension D der Menge oder des Objekts größer ist als dessen topologische Dimension.
5. Eine auf eher einfachen geometrischen oder mathematischen Operatoren basierende Konstruktion der Struktur, welche häufig einen rekursiven Charakter aufweist.

Die strenge Definition des Fraktals von Mandelbrot findet sich im Konzept von Falconer im Punkt vier wieder. Auch die Punkte eins, zwei, drei und fünf wurden von Mandelbrot in „Die fraktale Geometrie der Natur“ (22) als Eigenschaften von Fraktalen beschrieben, sodass dieses Konzept sowohl die Vielschichtigkeit eines Fraktals, als auch dessen Abgrenzung gegenüber Nicht-Fraktalen sehr gut abbildet.

Zudem sind Fraktale skaleninvariant, d. h. dass Eigenschaften wie die Detailgenauigkeit und der Grad an Irregularität über alle Größenbereichen konstant bleiben (22). Feder (155) führt zu Veranschaulichung das Beispiel einer Kumulus-Wolke an, welche über Ausbuchtungen verfügt. Bei genauerer Betrachtung zeigen sich auf den Ausbuchtungen noch kleine Beulen, die wiederum noch kleiner Ausbuchtungen tragen, die wiederum noch kleinere Beulen tragen. Dieses Muster wiederholt sich endlos bis zur aller kleinsten Auflösung. Dieses Beispiel erklärt sehr anschaulich die Eigenschaft der Skaleninvarianz. Fraglich ist jedoch, ob dies wirklich für ein natürliches Objekt wie eine Kumulus-Wolke gilt.

2.3.4 Sind natürliche Objekte fraktal?

Betrachtet man gewisse Formen und Strukturen in der Natur, so scheinen sich gewisse Elemente oder Prozesse auf verschiedenen Größenskalen zu wiederholen. Diese eigentlich den Fraktalen zugeschriebene Eigenschaft der Selbstähnlichkeit, führte zur Überlegung, ob auch natürliche Objekte Fraktale sind oder zumindest mit Methoden der fraktalen Geometrie untersucht werden können. Nach der Aussage Falconers (153) ein Objekt oder eine Form selbstähnlich, wenn es in eine bestimmte Anzahl kleinerer ähnlicher Kopien seiner selbst zerlegt werden kann. Beispiele hierfür sind berühmte Fraktale wie das Sierpinski-Dreieck oder die Koch-Kurve. Man unterscheidet zwei Formen der Selbstähnlichkeit: Die strikte Selbstähnlichkeit und die statistische Selbstähnlichkeit.

Spricht man von strikter Selbstähnlichkeit, so handelt es sich um eine exakte Wiederholung des Details auf jedem Level der Beobachtbarkeit (149). Die statistische Selbstähnlichkeit hingegen beschreibt die Tatsache, dass kleine Teilstücke dieselbe statistische Verteilung von Merkmalen wie die gesamte Menge aufweisen (153). Beispiele für das Vorkommen der statistischen Selbstähnlichkeit in der Natur sind beispielsweise das Verzweigungsverhalten von Pflanzen oder die Struktur und Topografie von Küstenlinien (22, 149).

Wie Peitgen et al. (156) am Beispiel eines Blumenkohls darstellen, verfügen Objekte der Natur über keine strenge Selbstähnlichkeit, da sie kein gleichbleibendes Detail über unendliche Größenbereiche aufweisen. Sie können jedoch bis zu einem gewissen Grad eine statistische Selbstähnlichkeit über einen gewissen Größenbereich besitzen. Statistische Selbstähnlichkeit ist im Gegensatz zur strikten Selbstähnlichkeit aber kein Beweis für einen fraktalen Charakter eines Objektes (150).

Weiterhin sind Objekte im strengen Sinne raumfüllend, wenn sie unendliche Länge besitzen und jeden Bereich des Raumes, in welchem sie existieren, ausfüllen. Ein Beispiel hierfür ist die Peano-Kurve (22). Dies gilt für natürliche Strukturen nicht. Sie zeigen zwar häufig die Tendenz ihre Oberflächenstruktur zu vergrößern, insbesondere wenn es darum geht Stoffaustauschflächen zu schaffen (156), füllen den Raum, in dem sie existieren, jedoch nie komplett aus. In diesem Sinne zeigen sie zwar ein raumfüllendes Verhalten, können aber nicht als streng raumfüllend bezeichnet werden (150).

Man erkennt die Tendenz Objekten aus der Natur fraktale Eigenschaften zuzuordnen und sie als Fraktale zu bezeichnen. Dies ist in gewisser Sicht verständlich, da die Ähnlichkeit zwischen natürlichen Objekten und Fraktalen oft verblüffend ist. Es ist jedoch eindeutig zu sagen, dass kein natürliches Objekt ein wirkliches Fraktal sein kann. Dies begründet sich schließlich in der Tatsache, dass ihre fraktal-definierenden Eigenschaften nicht über die gesamten Skalierungsmaßstäbe vorhanden sind. So kommen strenge Selbstähnlichkeit und ein nie geringer werdendes Detail über unendliche Skalenbereiche in der Natur nicht vor. Natürliche Objekte und deren Computer generierte Repräsentation sind nach dieser engen Definition nicht fraktal, auch wenn sie in der Literatur häufig so bezeichnet werden (150, 153). Audrey Karperiens Aussage (147), dass wahre Fraktale sich nicht in einer endlichen Welt manifestieren können, fasst den Sachverhalt gut zusammen.

Dennoch bemerken viele Mathematiker und Wissenschaftler wie Mandelbrot (22), Falconer (153) oder Barnsley (148), dass es durchaus Sinn machen kann, natürliche Objekte und Prozesse in gewissen Größenordnungsbereichen als Fraktale zu betrachten. Genauso wie die klassische Geometrie die Umlaufbahn eines Planeten um die Sonne als Kreis oder Ellipse approximiert werden kann, so können gewisse Formen und Prozesse der Natur mittels fraktaler Geometrie approximiert werden. Jelinek et al. (150) betonen, dass die fraktale Geometrie daher keine exakte Beschreibung der Natur ermöglicht, jedoch eine Annäherung an natürliche Prozesse. So können also analytische Verfahren der fraktalen Geometrie auf Objekte der Natur wie beispielsweise Zellen und Gewebe angewandt werden, auch wenn es sich nicht um Fraktale handelt. Die Anwendung beweist nicht, dass es sich wie bereits dargelegt bei den natürlichen Objekten um Fraktale handelt, sondern ermöglicht eine zusätzliche andersartige Wahrnehmung und Quantifizierung der Strukturen und Prozesse von natürlichen Objekten, welche sich aus der Erforschung der Fraktale entwickelt hat (150).

Um die mathematischen Mengen und Formen, welche in der theoretischen Mathematik als Fraktale bezeichnet werden, von den natürlichen Objekten und Phänomenen abzugrenzen, welche durch die fraktale Geometrie beschrieben werden können, wurden zahlreiche Begriffe eingeführt. Diese werden jedoch uneinheitlich genutzt. Mandelbrot (22) spricht in diesem Zusammenhang von „fraktalen Mengen“ für theoretische Fraktale und „natürliche Fraktale“ für natürliche Objekte und Phänomene. Falconer (153) hingegen spricht in diesem Sinne von sog. „exakten Fraktalen“ im Gegensatz zu „ungefähren Fraktalen“. Zwar fehlt eine einheitliche

Terminologie, dennoch sind sich die zentralen Autoren über die Rahmenbedingungen der Abgrenzungen der Begrifflichkeiten einig.

2.3.5 Parameter und Methoden zur Beschreibung und Vermessung von Fraktalen

Techniken zur Beschreibung und Vermessung der klassischen Geometrie wie Längenmaße eignen sich aufgrund deren Unendlichkeit, Irregularität und Komplexität nicht zur Untersuchung von Fraktalen. Daher wurde die fraktale Geometrie entwickelt, um die qualitative Untersuchung von irregulären Formen, welche faltig, gewunden, körnig, etc. sind, mit skalenunabhängigen Maßen zu ermöglichen (22). Das wichtigste Instrument der fraktalen Geometrie ist die fraktale Dimension (149, 153).

2.3.5.1 Fraktale Dimensionen:

Ein Vergleich von Fraktalen ist mittels verschiedener Maße möglich, welche man als fraktale Dimensionen bezeichnet. Diese dienen als objektives Hilfsmittel, um zu quantifizieren, wie dicht Fraktale den metrischen Raum ausfüllen und ist damit ein Maß für die Komplexität einer Struktur oder eines Musters (154). Ganz konkret steht die fraktale Dimension D für das Verhältnis des Details eines Musters und des angesetzten Maßstabes oder Auflösung (150). Dieses Verhältnis wird während der Änderung des Maßstabes beobachtet. Damit ermöglichen sie außerdem die experimentellen Vermessungen von Objekten und Mustern der realen Welt und weiterhin einen Vergleich mit Fraktalen (148, 157).

Diese Beziehung kann mit folgender Formel nach Karperien (157) beschrieben werden:

$$N \propto \varepsilon^{-D}$$

Es gilt:

N = Anzahl der Teile einer Struktur

ε = Maßstab

D = fraktale Dimension

Die Anzahl der Teile N ist dabei identisch mit dem Detail eines Musters.

Nochmals zu erwähnen ist, dass es nicht die eine fraktale Dimension gibt, sondern eine Vielfalt an fraktalen Dimensionen existiert, welche sich in der Art der Berechnung, der Anwendung auf die zu untersuchende Menge und Interpretation teils erheblich unterscheiden (153). Für die empirische Bestimmung sind nur jene Dimensionsdefinitionen anwendbar, welche sich auch zur Messung an natürlichen physikalischen Objekten, in unserem Fall Zellen und deren Verbände, eignen. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit nur jene fraktalen Dimensionsbegriffe vorgestellt, welche zur empirischen Messung in der entwickelten Methode benutzt werden oder als Grundlage oder Erklärungshilfe erster dienen.

Die Ähnlichkeitsdimension:

Die Ähnlichkeitsdimension D_s bezeichnet das Verhältnis zwischen der Anzahl an selbstähnlichen Teilen eines Musters und dem Maßstab zur Erzeugung dieser selbstähnlichen Teile (147). Damit kann sie insbesondere zur Abschätzung der fraktalen Dimension D von selbstähnlichen Fraktalen angewendet werden, da für diese beide Dimensionen übereinstimmen (155). Sie verdeutlicht aber auch, wie Falconer (153) bemerkt, auf sehr simple Weise das Prinzip der Selbstähnlichkeit und veranschaulicht die Grundzüge der Dimensionsbestimmung von anderen fraktalen Dimensionen wie bspw. der Kästchenzähldimension. Zudem legt sie deutlich die Unterschiede zwischen euklidischen Formen wie einer einfachen Linie und Fraktalen wie der Koch-Kurve dar.

Die Ähnlichkeitsdimension wird bestimmt, indem man ein gewisses Detail (i. d. R. die Anzahl der identischen Teile) einer geometrischen Figur durch den (Skalierungs-)Faktor teilt. Der Skalierungsfaktor ist hierbei das Verhältnis des Größenunterschieds der gesamten geometrischen Figur und den identischen Teilen N (149). Die Formel lautet:

$$D_s = \frac{\log(N)}{\log\left(\frac{1}{r}\right)}$$

Es gilt:

D_s = Ähnlichkeitsdimension

N = Anzahl der identischen Teile

r = Skalierungsfaktor

Im Folgenden ist eine die beispielhafte Berechnung der Ähnlichkeitsdimension am Beispiel eines euklidischen und eines Fraktals beschrieben.

Eine Linie der Länge 1 wird in 4 gleich große Stücke der Länge $\frac{1}{4}$ geteilt. Die Anzahl der Teile (das Detail) ist also 4. Der Skalierungsfaktor ist damit $\frac{1}{4}$. Teilt man nun den Logarithmus des Details durch den Logarithmus des Skalierungsfaktor erhält man das Verhältnis daraus, welches auch als Ähnlichkeitsdimension bezeichnet wird. In diesem Fall: $\log 4 \div \log \frac{1}{4} = -1$. Die Ähnlichkeitsdimension ist hierbei eine gerade Zahl und entspricht der euklidischen Dimension der geometrischen Figur. Dieser Fakt gilt für alle typischen euklidischen Körper wie beispielsweise Kurven, Quadrate oder Dreiecke (153).

Bei typischen mathematischen Fraktalen wie beispielsweise der Koch-Kurve verhält es sich hingegen anders. Wie in der Abbildung 20 im Anhang dargestellt, liegt das Detail bei 4 (da die geometrische Figur aus vier Teilen besteht), der Skalierungsfaktor jedoch bei $\frac{1}{3}$. In diesem Fall erhält man: $\log 4 \div \log \frac{1}{3} = -1,262$. In diesem Fall ist die Ähnlichkeitsdimension ungerade und entspricht nicht der vermuteten euklidischen Dimension von 1 einer Kurve (153). Das Fraktal nimmt mehr zweidimensionalen Raum ein als eine einfache Linie und ist damit raumfüllender (149).

Bei bekannten Fraktalen und einfachen euklidischen Formen ist die Beziehung zwischen Detail und Skalierung oftmals visuell oder, wie in Abbildung 20 gezeigt, aufgrund des zugrundeliegenden Algorithmus zu bestimmen (157). Dies gilt jedoch nicht für komplizierte Formen oder natürliche Objekte, sodass die Ähnlichkeitsdimension D_s für die empirische Messung natürlicher Objekte ungeeignet ist (153).

Kästchenzähldimension D_B :

Die Kästchenzähldimension wird auch als Box-Dimension oder Box-Counting-Dimension D_B bezeichnet. Weitere synonym benutzte Begriffe sind „Kapazitätsdimension“ oder „Kolmogorov Dimension“ (138). Dieser Dimensionsbegriff eignet sich aufgrund der weniger komplexen Berechnung und Anwendung besonders für viele Arten der empirischen Anwendung in den Naturwissenschaften und ist daher auch der meist Verwendete (153, 156). Weiterhin ist sie für beliebige Mengen definierbar und für gewisse Mengen kann sie der Hausdorff-Besicovitch-

Dimension und der Ähnlichkeitsdimension D_s entsprechen (153, 156). Sie ist deshalb auch im Versuchsaufbau dieser Arbeit die verwendete Dimension zur Vermessung der Proben. Tatsächlich ist die Bestimmung der Kästchenzähldimension aber nicht ausschließlich mit Gitterkästchen möglich. Es ist ebenso möglich abgeschlossene Kreise oder andere geometrische Objekte zu verwenden (153). Die Methode dieser Arbeit verwendet jedoch eine Anzahl von beschriebenen Gitterkästchen, welche eine Struktur überdecken, weshalb auf weitere Methoden der Bestimmung nicht näher eingegangen wird.

Empirische Bestimmung:

Wie bereits erwähnt ist die fraktale Dimension D durch das Verhältnis des Details zum vermessenden Maßstab definiert. Im Falle der Kästchenzähldimension wird der euklidische Raum mit dem zu vermessenden Bild mittels Kästchengitter von kleiner werdender Kästchengröße ε überlagert. Bei der Größe ε handelt es sich also um den Maßstab (Seitenlänge der quadratischen Kästchen in Pixel). Das Detail N entspricht den gezählten Kästchen, welche sog. Vordergrundpixel enthalten, also Pixel der zu untersuchenden Struktur. So erhält man für jede Kästchengittergröße ε einen Zahlenwert für N . Logarithmiert man nun dieses Verhältnis und trägt es in ein Koordinatensystem mit x - und y - Achse auf, so ergeben sich verschiedene Punktkoordinaten. Zur Bestimmung von D_B wird nun anhand dieser Punktkoordinaten eine Regressionslinie berechnet. Die Steigung dieser Regressionslinie stellt die Dimension D_B dar (138).

In dieser Arbeit wird die Kästchenzähldimension oder Box-Counting-Dimension D_B mittels der auf ImageJ basierenden Open-Source-Software „FracLac“ (157) berechnet. Die in FracLac verwendete Berechnung entspricht weitgehend den Formeln nach Falconer (153) oder Peitgen et al. (156).

$$D_B = \frac{\ln N}{\ln \varepsilon}$$

Es gilt:

D_B = Box-Counting Dimension oder Kästchenzähldimension

\ln = Abkürzung für \log_e , auch natürlicher Logarithmus genannt

N = Anzahl der Teile eines Musters (Detail), entspricht den gezählten Kästchen, die Pixel enthalten

ε = Maßstab, entspricht der Größe der verwendeten Boxen

2.3.6 Die fraktale Analyse – Grundlegender Aufbau und Ablauf

Bei der fraktalen Analyse handelt es sich um die Untersuchung eines Objektes oder Musters mittels fraktaler Geometrie. Hierbei wird das analysierte Objekt auf das Verhältnis der Größe oder Masse des Objekts und einen angelegten Maßstab untersucht. In Anlehnung an Jelinek et al. (150) und eigener Erkenntnisse im Rahmen dieser Arbeit, wird im Folgenden der grundlegende Aufbau einer Analysemethode und deren Ablauf in einzelnen Schritten dargestellt. Dieses Konzept wurde für diese Arbeit übernommen.

2.3.6.1 Auswahl der zu untersuchenden Strukturen je nach wissenschaftlicher Fragestellung

Um die gesetzte wissenschaftliche Fragestellung konkret beantworten zu können, sollten nur jene biologischen Strukturen untersucht werden, die hierfür wirklich benötigt werden. Werden zusätzliche Strukturen, und damit Informationen, extrahiert, könnten die gemessenen Ergebniswerte nachhaltig beeinflusst werden.

2.3.6.2 Digitale Repräsentation der zu untersuchenden Strukturen im geeigneten Größenmaßstab mit möglichst hoher Auflösung

Die digitale Repräsentation der Strukturen sollte so gewählt werden, dass einerseits der Größenmaßstab auf die Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung angepasst ist und andererseits die Auflösung möglichst hoch ist. So können alle relevanten Details der Strukturen möglichst originalgetreu in eine digitale Repräsentation überführt werden. Zudem sollten die digitalen Repräsentationen eine möglichst ähnliche Gesamtpixelzahl aufweisen.

2.3.6.3 Auswahl der geeigneten Software zur fraktalen Analyse und Auswahl der gewünschten bzw. geeigneten fraktalen Maße

Wie in dem folgenden Abschnitt erläutert wird, hängt es von den Eigenschaften der zu vermessenden digitalen Repräsentationen ab, welche Messmethoden und fraktalen Ergebnisparameter sich zur Analyse bevorzugt eignen. Zudem existieren verschiedene open-source Software-Programme zur fraktalen Analyse.

2.3.6.4 Auswahl von geeigneten Beispielbildern zu Kalibrierung der fraktalen Analyse-Software

Da es sich um empirische Messungen handelt, welche durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden können, sind verschiedene Messparameter der fraktalen Analyse an Beispielbilder mit bekannter fraktaler Dimension D zu testen. Die Kalibrierung erfolgt einerseits an digitalen Abbildungen von euklidischen Formen und andererseits an „Prefractals“, welche eine Ähnlichkeit mit den zu untersuchenden Strukturen aufweisen. Das Ziel ist die Auswahl einer Methode, welche eine Minimierung der Differenz zwischen theoretischem Wert und geschätztem Wert der Beispielbilder aufweist. Bei Fehlen einer ausreichenden Anzahl an Beispielbildern kann die Auswahl des Kästchengrößenmaximums, Kästchengrößenminimums, sowie der Kästchenintervalle unter Berücksichtigung der Vorgaben aus Kapitel 5.1.2.3 erfolgen. Es sollten mehrere variable Startpositionen des Kästchengitters verwendet werden, da die Vermessung eines Bildes mit verschiedenen Startpositionen und deren Verrechnung für eine Verringerung des Einflussfaktors der Startposition sorgt (157). FracLac bietet hier bereits die Möglichkeit, dass die Startposition zufällig gewählt wird und ein Mittelwert aller Messungen mit verschiedenen Startpositionen des Kästchengitters kann gebildet werden (147).

2.3.6.5 Ausschluss ungeeigneter Bilder

Zwar kann prinzipiell jedes digitale Bild mittels fraktaler Analyse vermessen werden. Jedoch kann sich, aufgrund von Schwächen und Limitationen der fraktalen Analyse, ein Teil der digitalen Repräsentationen der Strukturen weniger zur Analyse eignen. Dies können beispielsweise Artefakte in der histologischen Präparation von Gewebeschnitten oder eine zu kleine Repräsentation der zu vermessenden Strukturen sein. Daher sollte die zu vermessende Struktur erst ab einer Mindestpixelanzahl eingeschlossen und visuell begutachtet werden.

2.3.6.6 Extraktion der zu untersuchenden Strukturen und Optimierung der digitalen Repräsentation mittels geeigneter Software zur digitalen Bildverarbeitung

Die zur Untersuchung benötigte Analysesoftware bestimmt die fraktale Dimension anhand der Pixelstruktur eines digitalen Bilds. Daher muss die zu untersuchende Bilddatei in der Regel als binäres Bild, Graustufen- oder RGB-Bild vorliegen. Weiterhin müssen die zu untersuchenden Strukturen im digitalen Bild möglichst optimal, beispielsweise in Form eines Ein-Pixel-breiten Umrisses, dargestellt werden (20). Hierfür ist eine umfangreiche Bildbearbeitung nötig (157).

Diese kann mithilfe verschiedener Software oder Algorithmen geschehen. Es ist dabei zu beachten, dass jede Bildverarbeitung Informationen des Bildes verringern, verzerren oder auch hinzufügen kann. Damit hat jeder Bildverarbeitungsprozess das Potenzial auf den ermittelten Wert des fraktalen Parameters eine Auswirkung zu haben. Abschließend sollte die Interpretation der Ergebnisse unter Berücksichtigung dessen erfolgen, dass sich ein gewisser Messfehler nicht vermeiden lässt und verschiedene Anwender zu einer leicht abweichenden Auswahl an Messparametern und damit zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann. Die fraktale Dimension D sollte als nur bedingt präziser Wert betrachtet werden (154).

2.3.7 Anwendung der fraktalen Geometrie zur histopathologischen Analyse

Die Idee mittels fraktaler Geometrie eine objektive histopathologische Analyse von Tumoren zu entwickeln ist nicht neu. So ist deren breite Anwendung in der Tumorphologie in einigen Übersichtsarbeiten dargestellt (20, 158). Exemplarisch konnte in einer Studie eine Unterscheidung von lokal begrenzten Melanom und gutartigen Naevi auf Basis deren histopathologischer Umrisse mittels fraktaler Dimension als Differenzierungsfaktor festgestellt werden (159). Ein besonderer Fokus von fraktalen Anwendungsverfahren liegt zudem in der Tumorphologie auf der Detektion von Veränderung der Vaskularisation im Tumorgewebe (23). Zur Reduktion der Inter- und Intraobservervariabilität in der pathologischen Begutachtung von Prostatakarzinomen entwickelten Waliszewski et al. (25) auf Basis der Zellkerne der Tumorzellen ein fraktales Klassifikationsmodell der Gewebestruktur. Eine Stratifizierung in sieben Subklassen erfolgte anhand der fraktalen Kapazitätsdimension D_0 und zeigte eine 100% Übereinstimmung mit der Gleason-Klassifikation. Ein immer wiederkehrender Zusammenhang in vielen Studien ist der Fakt, dass schlecht differenzierte Karzinome im histologischen Präparat höhere Werte der fraktalen Dimension D aufweisen als gut differenzierte Karzinome oder gesundes Gewebe (27, 28, 30, 160). Dieser Zusammenhang zeigt sich meist unabhängig der Tumorentität, der Art der Berechnung der fraktalen Dimension und der histologischen Präparation. Eine Ausnahme bietet die Arbeit von Chan et al. (161), welche einen umgekehrten Zusammenhang darlegt. Eine beachtenswerte Untersuchung von Tambasco et al. (28) vermaß die Gewebestruktur des invasiven duktales Mammakarzinom an immunhistochemisch behandelten (Marker Pan-Zytokeratin) TMAs mittels fraktaler Geometrie. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante inverse Korrelation von hohen Werten der fraktalen Dimension D und reduziertem 10-Jahres-Gesamtüberleben. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte ebenso beim oralen

Plattenepithelkarzinom (27) eruiert werden. Eine prognostische Bedeutung der fraktale Dimension D bezüglich des Risikos der Fernmetastasierung beim Mammakarzinom konnte in der Studie von Rajkovic nachgewiesen werden (29). Allerdings erfolgte bei dieser Studie eine IF der histologischen Tumorpräparate nur mittels Pan-Zytokeratin als einzigem Biomarker, sodass es sich um keine Einzell-zell-basierte Detektionsmethodik handelte.

Bezüglich der Tumorinvasionsfront bzw. Epithel-Stroma-Grenze mittels Methoden der fraktalen Geometrie kann auf Landini und Rippin verwiesen werden (160). Diese analysierten die Grenze zwischen Epithel und Stroma bei Plattenepithelkarzinomen, epithelialen Dysplasien und Normalgewebe der Mundschleimhaut am HE-gefärbten histologischen Präparat. Auch hier zeigten sich erhöhte Werte der FD für Karzinome und Dysplasien im Vergleich zum Normalgewebe. Weiterhin konnte der Parameter FD einen höheren Grad der korrekten Klassifikation in die drei unterschiedenen histologischen Gruppen erreichen als ein menschlicher Observer.

Daten zur Untersuchung der Histologie des Plattenepithelkarzinom des Ösophagus sind rar. Hosseini et al. (162) etablierten erfolgreich eine Methodik zur Differenzierung von intraepithelialen low-grade Dysplasien und normalem Epithel des Ösophagus unter Zuhilfenahme der fraktalen Geometrie.

Zur Kombination von mIHC und fraktaler Analyse sind in der wissenschaftlichen Literatur ebenso nur wenige Untersuchungen vorhanden. Streba et al. etablierten bei 3-fach-IF (Marker Ki67, p53 und VEGF-C) bei Biopsaten von primär chirurgisch resezierten kolorektalen Karzinomen. In dieser Studie mit einer eher kleinen Fallzahl von 41 Patienten konnte mittels der fraktalen Dimension D ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Adenokarzinome und anderer histologischer Subtypen des kolorektalen Karzinoms sowie gut differenzierten und anderen Stadien detektiert werden (30).

Neuere Studien nutzen zudem künstliche Intelligenz. Chan et al. (161) entwickelten beispielweise einen automatisierten überwachten Machine-Learning-Algorithmus zur Klassifikation und Differenzierung von malignen und benignen Neoplasien des Brustgewebes. Das System zeigte einen hohen F1-Score und damit Potenzial für zukünftige Anwendungen.

3 Material und Methoden

3.1 Vorbemerkungen und Überblick des Versuchsaufbaus

Das Kapitel beginnt mit einer grafischen Übersicht des grundlegenden Versuchsaufbaus. Nachfolgend werden die Materialien zur Durchführung der mIF-Färbung und die verwendete Software zur digitalen Bildverarbeitung sowie fraktalen Analyse dargestellt.

Im Anschluss folgt die genauere Beschreibung der histologischen Proben sowie eine Beschreibung des Färbe-Verfahrens der mIF-Präparate, der digitalen Bildbearbeitung und fraktalen Analyse. Abschließend werden Details zur statistischen Auswertung erläutert.

Wichtige Anmerkung: Die Durchführung der mIF-Färbung und Digitalisierung erfolgte nicht durch den Promovierenden, sondern durch die leitende MTLA der Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Radioonkologie und Strahlentherapie, sowie die Firma „MORPHISTO GmbH“. Zu Beginn der Promotionsarbeit war dieser Prozess bereits abgeschlossen. Eine Liste für Materialien und Reagenzien sowie eine Beschreibung des Prozesses der Immunhistochemie (IHC) wurden dem Promovierenden zur Verfügung gestellt.

Die Hauptleistung des Promovierenden besteht in der Entwicklung der Methodik zur digitalen Bildanalyse und Musterextraktion mittels verschiedener open-source Software und fraktalen Analyse der Präparate sowie deren Auswertung und Interpretation.

3.2 Grafische Übersicht des grundlegenden Versuchsaufbaus

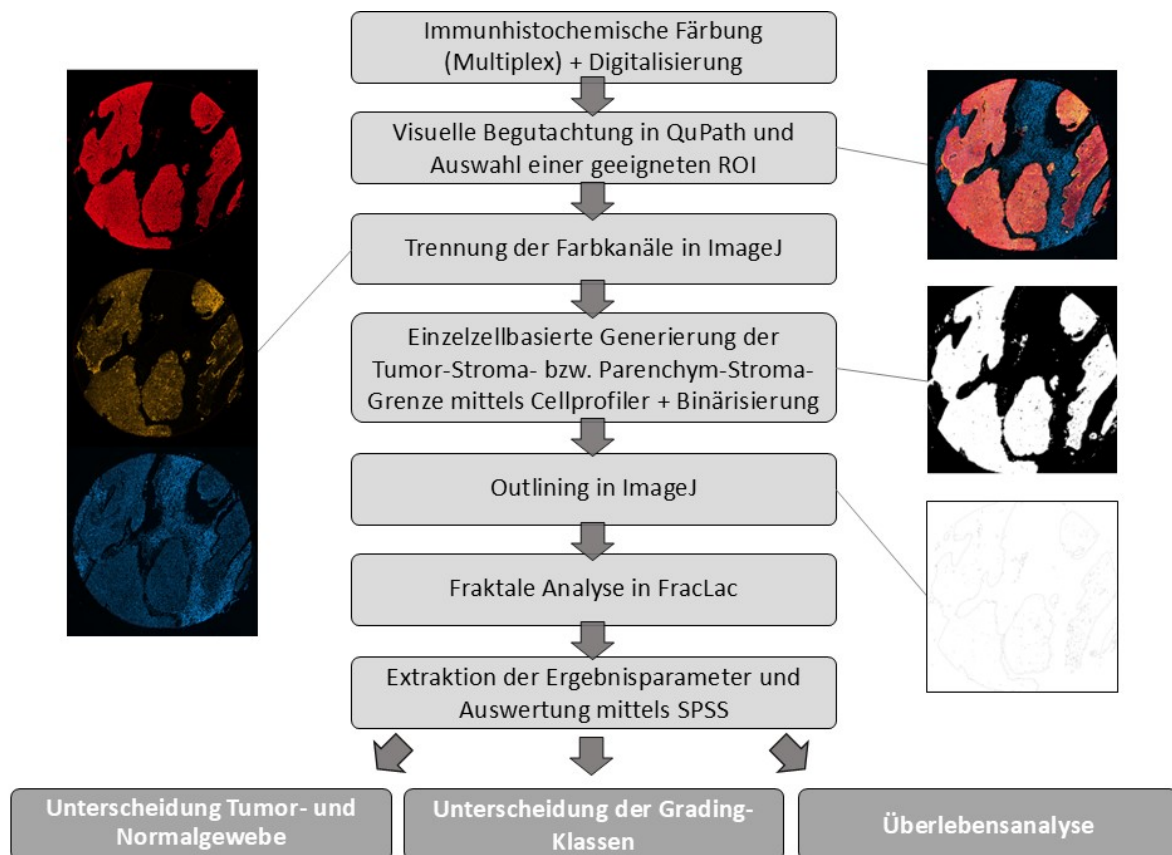


Abbildung 6: Flussdiagramm zur Darstellung des grundlegenden Aufbaus der entwickelten Methodik. Nach Durchführung der mIHC und Digitalisierung mittels Zeiss Digital Slidescanners erfolgt die visuelle Begutachtung der Immunfluoreszenzfärbung des TMA und Auswahl einer geeigneten ROI in QuPath (Bild oben rechts). Drei der vier verwendeten Farbkanäle Pan-Zytokeratin (rot), E-Cadherin (gelb) und DAPI (blau) werden mittels ImageJ separiert (Bild links). In Cellprofiler werden, mithilfe zweier selbst-konstruierter Pipelines, die Nuklei und Zellmembranen auf Basis der Marker DAPI und Pan-Zytokeratin sowie DAPI und E-Cadherin detektiert, Stroma-Zellen von Tumorzellen bzw. Plattenepithelzellen separiert und ein binäres Bild erschaffen (Bild rechts mittig). Auf Grundlage dieser Einzelzell-basierten Detektion kann im Programm „ImageJ“ die Tumor-Stroma- bzw. Epithel-Stroma-Grenze erfasst (Bild rechts unten) und in das ImageJ-Plugin „FracLac“ exportiert werden. Das Plugin „FracLac“ misst die fraktale Dimension D_B des importierten Bildes und liefert einen numerischen Wert. Dieser wird bezüglich der Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe sowie der Grading-Klassen und hinsichtlich seiner prognostischen Bedeutung im Hinblick auf das Gesamtüberleben untersucht.

3.3 Materialien für die Immunfluoreszenzfärbung und Digitalisierung der Präparate

3.3.1 Laborgeräte

Gerät	Beschreibung	Lieferant
Axio Imager M2		Carl-Zeiss
Färbekammer	Stain Tray Schwarz für 200 Objektträger	Carl-Roth GmbH + Co. KG
Feinwaage	Extend	Sartorius
Gefrierschrank		Liebherr
Mikrowelle		Bosch
pH-Meter	Lab 850	Schott Instruments
Rührer	MR3000	Heidolph
Schüttler	Polymax 1040	Heidolph
Thermomixer	Thermomixer Compact	Eppendorf
Timer		Macherey-Nagel
Waage	Adventurer Pro AV2101	Ohaus
Wärmeschrank	TV-40u	Memmert (Schwabach)

Tabelle 3: Verwendete Geräte für die mIHC und Digitalisierung der Präparate

3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Beschreibung	Lieferant
Alufolie		Carl-Roth GmbH
Deckgläser	Größe 24x32 mm	Carl-Roth GmbH
Deckgläser	Größe 24x50 mm	Carl-Roth GmbH
Deckglaspinzette 18/8		Carl-Roth GmbH
Färbegestell für 10 Objektträger		Carl-Roth GmbH
Färbekästen und Einsätze aus PMP		Carl-Roth GmbH
Färbekästen aus Kalk Soda Glas		Carl-Roth GmbH
Färbesystem aus SMGGlas		Carl-Roth GmbH
Kimtech science	Präzisionstücher	Kimberly-Clark
Laborflasche	1000 ml Fassungsvermögen	Schott Duran
Latex-Handschuhe		VWR
Messröhrchen	Cellstar Tubes (15ml)	Greiner Bio-one
Messröhrchen	Cellstar Tubes (50ml)	Greiner Bio-one
Messtrichter		Vit-Lab

Mikroreaktionsgefäße	reaction tubes 1,5ml	Greiner Bio-one
Nitril-Handschuhe		VWR
Rotilabo Einmal Wägeschalen aus PS		Carl-Roth GmbH
Objektträger Thermo- Scientific		Menzel GmbH
pH-Fix 0-14	100 farbfixierte Indikationsstäbchen	Carl-Roth GmbH
Pipette	Eppendorf research 10 µl	Eppendorf
Pipette	Eppendorf research 100 µl	Eppendorf
Pipette	Eppendorf research 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitze	10/20 µl XL graduated tip	Tip One
Pipettenspitze	200 µl yellow tip	Tip One
Pipettenspitze	1000 µl blue graduated tip	Tip One

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die mlHC

3.3.3 Reagenzien und Lösungen

Reagenzien (R)	Lieferant, Bestell-Nummer
R1: Xylol	AppliChem, #A2476.5000
R2: Ethanol, histologische Qualität (100%, 96%, 70 %)	Roth, #K928.4, #T171.4, #T913.2
R3: Deionisiertes Wasser (dH ₂ O)	Braun Melsungen AG, #82479E

<p>R4: TBS-T Waschpuffer</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>TBS-T Stammlösung</u>: 10x <u>Tris gepufferte Kochsalzlösung mit 0.1% Tween® 20</u>, pH 7.6 (50 mM Tris, 300 mM NaCl) <ul style="list-style-type: none"> ○ Tris HCl 65.7 g ○ Tris Base 10.1 g ○ NaCl 175.3 g ○ in 800 mL dH₂O auflösen, pH (7.6) prüfen ○ 10 mL Tween® 20 zugeben ○ dH₂O bis zu einer Gesamtmenge von 1000 mL hinzugeben • zur Herstellung von 1L TBS-T <u>Arbeitslösung</u>: <ul style="list-style-type: none"> ○ 100 mL 10-fachen TBS-T Stammlösung zu 900 mL dH₂O hinzufügen 	<p>Roth, Tris Hydrochlorid #9090.3</p> <p>Roth, Tris #4855.1</p> <p>Roth, Natriumchlorid #9265.2</p> <p>Roth, Tween 20 #9127.1</p>
<p>R5: Dulbecco's <u>phosphatgepufferte Kochsalzlösung</u> (ohne Ca²⁺ /Mg²⁺), PBS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zur Herstellung einer <u>10-fachen Stammlösung</u> 95.5 g Dulbecco's <u>phosphatgepufferte Kochsalzlösung</u> (ohne Ca²⁺ /Mg²⁺) zu 1L dH₂O hinzufügen • Zur Herstellung von 1L <u>1x PBS Arbeitslösung</u>: zu 100 mL 10x PBS-Stammlösung zu 900 mL dH₂O hinzufügen 	<p>Biochrome AG, #L-182-01</p>
<p>R6: Citrat 10 mM Natriumcitrat, pH 6,0 Antigen-Demaskierungslösung</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Citrat 0.1 M Stammlösung A</u>: 21.01 g C₆H₈O₇ × H₂O 1L dH₂O hinzufügen (bei 2-8 °C lagern) • <u>Citrat 0.1 M Stammlösung B</u>: 29.41 g C₆H₅ Na₃O₇ × 2H₂O 1L dH₂O hinzufügen (bei 2-8 °C lagern) • Zur Herstellung von 500 mL Natriumcitrat-Arbeitslösung: 9 mL Stammlösung A und 41 mL Stammlösung B zu 450 mL dH₂O, hinzufügen, mit einem pH-Meter auf pH 6.0 prüfen 	<p>Roth, #3958.2</p> <p>Roth, #3580.1</p>

<p>R7: 10 mM Kupfer-Ammoniak-Acetat pH 5.0 zur Reduzierung der Autofluoreszenz</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1.93 g Ammoniak-Acetat (CH₃CO₂NH₄) <ul style="list-style-type: none"> ○ in dH₂O auflösen und den pH-Wert mit 1.0 M HCl auf 5,0 einstellen • 1.25 g Kupfer-Sulfat (CuSO₄ H₂O) zur Ammoniak-Acetat-Lösung hinzufügen <ul style="list-style-type: none"> ○ Auflösen und mit 1.0 M NaOH auf pH 5,0 einstellen 	<p>Roth, Ammoniak-Acetat #7869.1</p> <p>Roth, Kupfer-Sulfat #P023.1</p>
<p>R8: Antikörper-Verdünnungsmittel</p>	<p>DAKO, #S0809</p>
<p>R9: Detektions-Kit: ImmPRESS™ HRP IgG (Peroxidase) Polymer</p>	<p>VECTOR laboratories, Anti-Kaninchen, #MP-7401 Anti-Maus, #MP-7402</p>
<p>R10: TSA® Plus Fluorescein-Kit</p>	<p>PerkinElmer, #NEL741001KT</p>
<p>R11: TSA® Plus Cyanin-5-Kit</p>	<p>PerkinElmer, #NEL745001KT</p>
<p>R12: TSA® Plus Cyanin-3-Kit</p>	<p>PerkinElmer, #NEL744001KT</p>
<p>R13: Fluoreszierendes Einbettungsmedium</p>	<p>DAKO, #S3023</p>
<p>R14: DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>DAPI Stammlösung</u> gemäß den Empfehlungen des Herstellers verdünnen und Aliquots bei – 20°C lichtgeschützt aufbewahren • Für die Arbeitslösung: 1:2000 mit dH₂O verdünnen (lichtgeschützt), immer frisch ansetzen 	<p>Thermo Fisher Scientific, #D1306</p>

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Lösungen für die mIHC mit Lieferanten-Angabe und Bestellnummer.

3.3.4 Antikörper

Antikörper	Lieferant
E-Cadherin (24E10)	Cell Signaling
Pan Cytokeratin Plus (CM162B)	Biocare Medicals
Anti-Carbonic Anhydrase IX (EPR415(2))	Abcam

Tabelle 6: Verwendete Antikörper zur mIF-Färbung mit Lieferanten.

Antikörper	Puffer zur Antigen-Demaskierung	Verdünnung	Fluorochrom/ Verdünnung
E-Cadherin (24E10)	Citratpuffer, pH 6	1:100	Cyanin-3 (1:50)
Pan Cytokeratin Plus (CM162B)	Tris/EDTA, pH 9	keine	Cyanin-5 (1:50)
Anti-Carbonic Anhydrase IX (EPR415(2))	Tris/EDTA, pH 9	1:200	Fluorescein

Tabelle 7: Verwendete Antikörper mit Puffern zur Antigenmaskierung sowie Fluorochrome.

3.3.5 Softwareprogramme für die digitale Bildbearbeitung und fraktale Analyse

Name der Software	Version	Quelle
QuPath Open Software for Bioimage Analysis	v0.2.0-m5	https://qupath.github.io/ , (163)
ImageJ Image Processing and Analysis in Java	1.51w	https://imagej.net/ij/index.html , (164)
Fractal Dimension and Lacunarity („FracLac“, ImageJ Plugin)	Version 2015 Apra4308	https://imagej.net/ij/plugins/fracLac/fracLac.html , (157)
CellProfiler Cell image analysis software	Version 3.1.9	https://cellprofiler.org , (165, 166)
SPSS Statistics	Version 30.0.0	IBM, Armonk, USA

Tabelle 8: Verwendete Software mit Angabe der Version und Quelle.

3.4 Beschreibung histologische Proben

Im Rahmen dieser Arbeit standen initial insgesamt 344 HE-gefärbte TMAs mit Gewebe von Plattenepithelkarzinomen und Normalgewebe des Ösophagus des Menschen zur Verfügung. Diese entstammen zwei TMA-Datensätzen des Unternehmens TissueArray.Com LLC. Zum Zeitpunkt der Probenversendung wurden diese noch durch das Unternehmens US Biomax vertrieben. Es handelt sich um die TMA-Datensätze HEso-Squ172Sur-01 und HEso-Squ172Sur-02.

HEso-Squ172Sur-01 enthielt insgesamt 172 TMAs. Diese stammten von insgesamt 86 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, welche zwischen Juni 2006 und Dezember 2012 chirurgisch reseziert worden sind. In 78 der 86 Fälle lag jeweils ein TMA des Tumors und ein TMA mit Normalgewebe desselben Patienten vor. In den restlichen 8 Fällen

lagen jeweils 2 Tumor TMAs eines Patienten vor. Die Patienten wurde 3,6 bis maximal 6 Jahre nachbeobachtet.

HEso-Squ172Sur-02 enthielt ebenfalls insgesamt 172 TMAs. Diese entstammten von insgesamt 93 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, welche zwischen Januar 2009 und Januar 2010 chirurgisch reseziert worden sind. In 79 der 93 Fälle lag jeweils ein TMA des Tumors und ein TMA mit Normalgewebe desselben Patienten vor. In den restlichen 14 Fällen lagen jeweils 1 TMA des Tumors eines Patienten ohne korrespondierendes Normalgewebe vor. Die Patienten wurden 3-4 Jahre nachbeobachtet.

Beide Datensätze waren bereits anonymisiert. Zu beiden TMA-Datensätzen lagen klinische Daten des Patientenkollektivs bei. Hierzu zählten: ID des TMA, Patientenalter, Geschlecht, Organ, Pathologische Diagnose. Im Falle eines Tumorpräparates lagen zusätzlich noch Informationen bzgl. der TNM-Klassifikation, des histologischen Grading, des Staging nach AJCC 7th Ed., des Tumortyps (in allen Fällen Plattenepithelkarzinom des Ösophagus), des Operationsdatum, des Überlebensstatus, der Überlebenszeit (bis zur Beendigung der Nachbeobachtungsphase) sowie des Endes der Nachbeobachtungsphase vor. Insgesamt waren nicht für alle TMAs klinische Daten über die TNM-Klassifikation und das Staging vorhanden. Informationen über eine neoadjuvante Vorbehandlung lagen nicht vor. Ebenso lagen keine Informationen über die Herkunft der Spender, deren Behandlungszentren sowie die Lokalisation des Karzinoms innerhalb des Ösophagus vor.

3.5 Methodik der Multiplex-Immunhistochemie und Digitalisierung

Zur mIF-Färbung des TMAs wird ein angepasstes standardisiertes Protokoll (167) verwendet, welches auf der Methodik von Tóth & Mezey (168) basiert. In dieser Arbeit wird eine 4-Kanal-IF-Färbung mit den primären Antikörpern gegen Pan-Zytokeratin, E-Cadherin, Carboanhydrase IX in Kombination mit einem sekundären Antikörper und einem Tyramidgekoppelten Fluorochrom (TSA) sowie dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI durchgeführt. Dabei dient Pan-Zytokeratin als sensitiver und spezifischer Marker des epithelialen Kompartiments von Tumor- und Normalgewebe (36), E-Cadherin als Marker der epithelialen Zellkohesität (54) und die Carboanhydrase IX als Marker der Ausbreitung der Hypoxie-Zonen im Gewebe (169).

3.5.1 Verfahrensprotokoll der Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbung

Im ersten Schritt werden die TMAs in horizontaler Lage für eine Stunde lang bei 60 °C in einem Wärmeschrank inkubiert, um das Paraffin zu schmelzen und an den Objektträgern zu befestigen. Der zweite Schritt dient der Entparaffinierung und Hydrierung. Dabei erfolgt initial eine Inkubation in drei aufeinanderfolgenden Xylol-Bädern für jeweils 10 Minuten mit anschließender Spülung der Präparate in einer alkoholischen Lösung mit absteigender Ethanolkonzentration (5 Minuten in 100 % Ethanollösung, 5 Minuten in 95 % Ethanollösung und 2 Minuten in 70 % Ethanollösung). Abschließend folgt noch eine einmalige Spülung in deionisiertem Wasser und in TBS-T-Lösung für jeweils zwei Minuten. Der dritte Schritt dient der Antigen-Demaskierung. Die Präparate werden zuerst in 10 mM Natriumcitrat-Puffer in der Mikrowelle für 90 Sekunden zum Sieden gebracht und anschließend weitere 15 Minuten unterhalb der Siedetemperatur inkubiert. Abschließend erfolgt eine Abkühlphase mit einer Dauer von 30 Minuten und eine Behandlung in PBS. Zur Generierung einer hydrophoben Barriere wird im vierten Schritt ein Barriertestift verwendet und die Präparate erneut mit PBS behandelt. Ein bekanntes Problem bei der mIF ist die sog. Autofluoreszenz (170). Um diesem Störfaktor vorzubeugen erfolgt im fünften Schritt eine Reduktion der Autofluoreszenz (engl. Quenching). Hierbei erfolgt nach der zweimaligen Spülung (je 10 Minuten) mit PBS und der einmaligen Spülung über 5 Minuten mit deionisiertem Wasser, die Behandlung mit Kupferammoniakacetat in einer befeuchteten Kammer bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Anschließend erfolgen Spülungen mit deionisiertem Wasser (einmalig für 5 Minuten), PBS (zweimalig für je 10 Minuten) und TBS-T (einmalig für 2 Minuten). Der folgende sechste Schritt dient der Vorbereitung des primären Antikörpers. Dazu wird der primäre Antikörper mit PBS verdünnt und für mindestens 30 Minuten bei 27°C unter Verwendung eines Thermomixers inkubiert. Nachfolgend erfolgt im siebten Schritt der Vorgang der Blockierung. Initial wird Antikörperverdünnungsmittel (R8) bei Raumtemperatur auf jedes Präparat aufgebracht und in einer befeuchteten Kammer inkubiert. Anschließend wird überschüssiges Verdünnungsmittel durch Klopfen auf ein Papiertuch entfernt. Im achten Schritt werden nun 100-250 µl des vorgewärmten Primärantikörper (siehe Tabelle 7 oben bzgl. der verwendeten Antikörper, Konzentrationen und Puffer) zum Präparat hinzugegeben und bei 27-28°C im Wärmeschrank für 60 Minuten inkubiert. Nachfolgend wird die Antikörperlösung entfernt und die Präparate dreimal für jeweils 2 Minuten mit TBS-T (R4) gespült. Anschließend werden die Präparate mit 100-250 µl des, für den primären Antikörper spezifischen, Detektionsreagenzes ImmPRESS™

HRP IgG (Peroxidase) Polymer (R9) behandelt und anschließend in einer befeuchteten Kammer bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgt das dreimalige Spülen unter leichtem Schütteln für jeweils zwei Minuten mit TBS-T. Im Folgenden wird im neunten Schritt das TSA hinzugefügt. Dafür werden 100-250 µl der verdünnten Lösung pro Objektträger aufgetragen und 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer befeuchteten, lichtgeschützten Kammer inkubiert. Anschließend wird der Objektträger mit TBS-T (R4) dreimalig und lichtgeschützt gespült.

Im Anschluss erfolgt eine erneute Quenching-Sequenz mit Natriumcitratpuffer und Mikrowellenbehandlung nach gleichem Schema wie in Schritt 5. Nachfolgend erfolgt erneut eine einmalige Spülung mit deionisiertem Wasser und TBS-T für jeweils 2 Minuten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine 4-Kanal-IF-Färbung der Proben durchgeführt, weshalb eine Wiederholung von Schritt 6 bis 9 mit den zwei verbleibenden Antikörpern, Detektionsreagenzien und TSAs erfolgt. Als letzter Schritt erfolgt die Färbung mit DAPI (R14). Dabei werden 150-250 µl der DAPI-Arbeitslösung jedem Präparat zugegeben und in einer befeuchteten Kammer bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Dann erfolgt eine zweimalige Spülung mit PBS für 5 Minuten.

Abschließend werden die Präparate mit Deckgläsern unter Verwendung von fluoreszierendem Einbettungsmedium (R13) auf Raumtemperatur und vor Licht geschützt eingebettet. Die fertig gefärbten Präparate können nun über Nacht in horizontaler Lage trocknen.

3.5.2 Digitalisierung mit dem Zeiss AxioScan Z.1

Zur Digitalisierung der Präparate werden diese an den Scanservice der Firma „MORPHISTO GmbH“ in Frankfurt am Main versendet und dort mittels eines Zeiss Digital Slidescanners (Zeiss AxioScan Z.1) digitalisiert und im .dzi.-Format gespeichert.

3.6 Digitale Bildverarbeitung und fraktale Analyse-Methode

3.6.1 Beurteilung und Vorbereitung der digitalen Präparate in QuPath

Die initiale Bearbeitung und Beurteilung der gefärbten Präparate erfolgte in QuPath. Bei QuPath handelt es sich um ein open-source Programm, welches zur Darstellung, Bearbeitung und Analyse digitalisierter histologischer Präparate genutzt werden kann. Hierfür bietet QuPath neben hochwertiger Biomarker-Identifikation auch diverse

Bildverarbeitungsoperatoren und automatisierte Analysealgorithmen an (163). In einem ersten Schritt wurden die digitalisierten Präparate in QuPath geöffnet und eine Anpassung von Helligkeit und Intensität der IF-Kanäle vorgenommen:

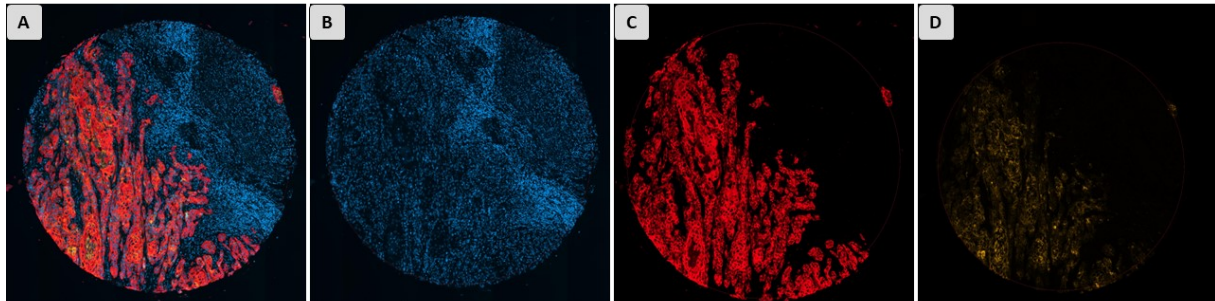


Abbildung 7: Darstellung eines Tumor-TMA und isolierte Betrachtung der drei verwendeten IF-Kanäle DAPI (blau), Pan-Zytokeratin (rot), E-Cadherin (gelb). A: Kombinierte 3-Kanal-IF eines Gewebeschnitts eines Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Gut erkennbar ist das fingerförmige Infiltrationsmuster; B: DAPI-Kanal mit Färbung aller Zellkerne; C: Pan-Zytokeratin-Kanal mit Färbung des epithelialen Kompartiments; D: E-Cadherin-Kanal.

Es erfolgt eine visuelle Begutachtung der digitalen Präparate zur Überprüfung des Färbeverhaltens, Mängel der histologischen Präparation und der Menge an vorhandenem Gewebe. Hierbei wurden Präparate von der weiteren Analyse ausgeschlossen, welche:

- 1) Eine unzureichende/inadäquate immunhistochemische Färbung aufwiesen
- 2) Eine zu geringe Menge an Tumorgewebe innerhalb der Tumor-TMAs aufwiesen
- 3) Eine zu geringe Menge an Normalgewebe innerhalb der Normalgewebe-TMAs aufwiesen

Insgesamt wurden aufgrund der genannten Kriterien 53 von 344 Präparaten nicht in die Analyse aufgenommen. Anschließend wurde der zu analysierende Bildbereich, die sog. ROI, definiert. Da die empirische Bestimmung der fraktalen Box-Counting-Dimension D_B auf der Basis von digitalen Pixeln basiert, wurde zur Reduktion eines Bias versucht, die ROI möglichst nahe um den Wert von 5000*5000 Pixel zu wählen. Abschließend wurde die Datei inklusive der gesetzten ROI als tiff.-Datei exportiert.

3.6.2 Erste Bearbeitung in ImageJ

Nach Import der Datei in ImageJ, ein open-source Programm zur Bearbeitung und Analyse von vorrangig naturwissenschaftlich-medizinischen Bilddateien (164), erfolgte dort eine Separation der vier verschiedenen Farbkanäle (repräsentieren die Intensität der Expression

der drei Antigene Pan-Zytokeratin, E-Cadherin und Carboanhydrase IX sowie DAPI) in vier Einzelbilder, welche jeweils einen Farbkanal repräsentieren. Da der Carboanhydrase IX-Farbkanal kein Teil des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Studiendesigns ist, wurde das generierte Bild des Carboanhydrase IX-Farbkanals verworfen. Anschließend wurde die generierten Dateien in tiff.-Format erneut exportiert.

3.6.3 Zellerkennung und Separation in CellProfiler

Herausfordernd in jeder digitalen histologischen Analyse ist die automatische Einzelzellsegmentation und Separation der einzelnen Zelltypen. Da insbesondere die Generierung und der Export eines Overlays der Gewebeumrisse mit QuPath nicht zufriedenstellend möglich war, wurde die Software Cellprofiler verwendet. Bei Cellprofiler handelt es sich um eine open-source Software des Broad Institutes, einer Kooperation des MIT und der Harvard Universität. Cellprofiler ermöglicht die digitale und automatisierte Darstellung sowie Identifikation einzelner Zellen und Zellbestandteile anhand ihrer Morphologie, Größe und Färbeintensität. Weiterhin lassen sich verschiedenste Parameter wie Art der Morphologie, Anzahl oder Größe ermitteln. Darüber hinaus ermöglicht Cellprofiler die Separation oder Summation identifizierter Zellen und eine weitreichende Bearbeitung der erstellten Bilder.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Cellprofiler insgesamt zwei sog. Pipelines erstellt, welche die Morphologie der Tumorinvasionsfront anhand der Pan-Zytokeratin-Expression sowie der E-Cadherin-Expression der Zellen möglichst exakt darstellen sollten. Der DAPI-Farbkanal wurde in beiden Pipelines zur Identifikation der Zellkerne genutzt. Eine Pipeline kombiniert verschiedene digitale Bildverarbeitungsoperatoren und führt diese in einem linearen Prozess hintereinander aus. Dies ermöglicht die Prozessierung großer Datenmengen nach den exakt gleichen Parametern.

In beiden Pipelines werden zunächst die Zellkerne detektiert. Auf Basis der Signal-Intensität des DAPI-Farbkanals wurden ein oberer und unterer Grenzwert der Farbintensität definiert. Zudem wurde ein Grenzwert für die minimale und maximale Pixelanzahl festgelegt, welches ein Zellkern aufgrund seiner geschätzten Größe enthalten darf. Als Ergebnis dieser zwei Parameter und weiterer Korrekturfaktoren bestimmt Cellprofiler Objekte, welchen den

Zellkernen entsprechen. Die Festlegung oberer und unterer Grenzwerte geschah mittels visuellen Abgleichs der entstandenen Bilder und den digitalen Gewebeschnitten in QuPath.

Auf Grundlage der detektierten Zellkerne wurden diesen nun die Zellkörper zugeordnet. In Pipeline 1 wurde hierzu die Intensität des Färbekanal von Pan-Zytokeratin und in Pipeline 2 von E-Cadherin genutzt. Erneut erfolgte die Festlegung oberer und unterer Grenzwerte der Farb-Intensität und anschließendem visuellen Abgleich. Da der DAPI-Färbekanal sämtliche DNA der Zellkerne des Gewebeschnittes erfasst, also auch sämtliche Stroma- und Immunzellen, welche kein Pan-Zytokeratin oder E-Cadherin exprimieren, erfolgte nachfolgend mittels Filter die Subtraktion alle detektierten Zellkerne, welchen keinen Zellkörper auf Grundlage der Pan-Zytokeratin- bzw. E-Cadherin-Expression zugewiesen wurde.

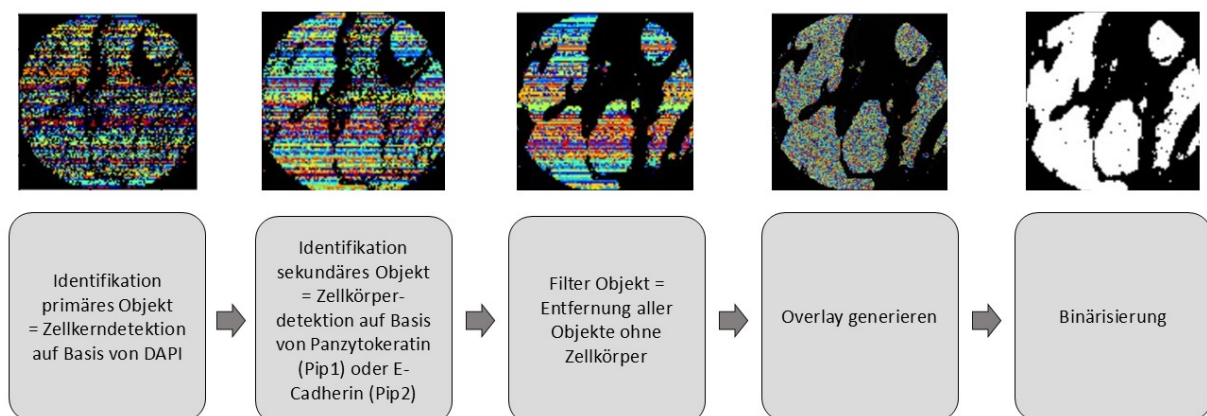


Abbildung 8: Darstellung des grundlegenden Aufbaus der Cellprofiler-Pipeline.

Das Ergebnis der beschriebenen Prozessierung (siehe Abbildung 8) ist die gesamte Menge der im digitalen Schnitt dargestellten Zellen, welche Pan-Zytokeratin bzw. E-Cadherin exprimieren. Da Pan-Zytokeratin ein spezifischer Marker von Zellen des Plattenepithels ist und E-Cadherin i. d. R. nur von epithelialen Zellen exprimiert wird, handelt es sich hierbei nur um Tumorzellen bzw. gesunde Epithelzellen des Ösophagus. Zur weiteren Verarbeitung wird nun ein Overlay dieser Zellen erstellt und zunächst in ein grauskaliertes Bild überführt. Folgend wird dieses grauskalierte Bild dann mittels Schwellenwert-Verfahren in ein binäres Bild überführt und als tiff.-Datei exportiert.

3.6.4 Endbearbeitung in ImageJ

Da das ImageJ Plugin FracLac, mit welchem die fraktale Analyse durchgeführt wird, für die Analyse mit binären Bildern programmiert wurde, wurde die Binärisierung bereits in Cellprofiler durchgeführt. Die so generierten Bilder stellen die gesamte Masse aller Tumorzellen bzw. gesunden Epithelzelle dar. Um die reine Morphologie der Tumorstroma-Grenze bzw. Epithel-Stroma-Grenze der fraktalen Analyse zuzuführen, wurde in einem letzten Arbeitsschritt aus den in Cellprofiler generierten binären Bilder nun der reine Umriss der Gewebestruktur mittels des ImageJ Befehls „Process/Binary/Outline“ extrahiert. Die generierte Struktur stellt die Tumorstroma-Grenze bzw. Epithel-Stroma-Grenze als 1-Pixel-weite Linie dar. Die fertig bearbeiteten Bilder wurden erneut als tiff.-Datei gespeichert und in das ImageJ Plugin FracLac überführt.

3.6.5 Fraktale Analyse mit dem ImageJ-Plugin FracLac

Sofern nicht anders aufgeführt, stammen die Beschreibungen und Erläuterungen zur Methodik von FracLac von der zum Plugin gehörenden offiziellen Website (157). Bei FracLac handelt es sich um ein frei verfügbares ImageJ-Plugin. Es ist ein Bildanalyse-Programm, welches diverse Arten der fraktalen Analyse und die Berechnungen verschiedener Parameter der fraktalen Geometrie und Textur-Analyse ermöglicht.

Diese Arbeit beschränkt sich auf die Anwendung der Standard-Box-Counting-Methode. Wie bereits beschrieben, wird die fraktale Box-Counting-Dimension D_B aus dem logarithmierten Verhältnis des Details N (in der empirischen Messung die Anzahl an Kästchen, welche Vordergrundpixel enthalten) und der Größe ε (in der empirischen Messung die Seitenlänge der quadratischen Kästchen in Pixel) gebildet. Das fraktale Analyse-Tool FracLac berechnet hierfür verschiedene Gitterraster mit aufsteigender Seitenlänge ε und ermittelt dann das Detail N anhand der Menge der enthaltenen Pixel in jeder Box. Anschließend werden die Werte in einem logarithmischen Regressionsgraphen aufgetragen und die D_B als Steigung dieses Graphen ermittelt.

FracLac bietet verschiedene Möglichkeiten zur Berechnung des Gitterrasters. Da aufgrund von Größe und Komplexität der auszuwertenden Bilder, nur eine sehr geringe Menge an adäquaten Beispielbildern zur Verfügung stand, wurden zwei verschiedene

Berechnungsgrundlagen der Gitterraster für diese Arbeit verwendet. In der ersten Gitterraster-Methodik Nummer 1 (GR-Nr.1) wird das sog. „Default Sampling Sizes“ verwendet. Nach Definition eines Boxgrößenminimums (Min, in Pixel) und Boxgrößenmaximums (Max, in % der Pixel des Gesamtbildes) nimmt die Boxgröße linear um einen festgelegten Wert zu. Dieser Wert berechnet sich in dem der Bereich zwischen Min und Max durch die Anzahl an gewünschten Gitterrastern (Sizes) dividiert wird.

Gitterraster-Methodik Nummer 2 (GR-Nr.2) basiert auf der sog. „Power Series“. Dabei wird initial ein Basis-Wert (Base, in Pixel) und ein Exponent (Exp, dimensionslos) definiert. Es handelt sich um eine exponentielle Erhöhung der Boxgrößen des Gitterrasters. Bei jeder Erhöhung wird der Exponent mit sich selbst addiert.

Aufbauend auf den Erläuterungen und Überlegungen aus Kapitel 2.3.6. wurden für GR-Nr.1 und GR-Nr.2 die benötigten Parameter definiert. Diese sind in Tabelle 9 dargestellt.

Gitterraster-Methodik	Berechnungsgrundlage	num G	Sizes	Min	Max	Base	Exp
GR-Nr. 1	Default Sampling Sizes	10	100	2	40	-	-
GR-Nr. 2	Power Series	10	100	2	40	2	2

Tabelle 9: Aufstellung der beiden Methodiken zur Berechnung der Gitterraster in FracLac. Ganz links sind die beiden verschiedenen Methodiken aufgezählt. Es folgen von links nach rechts: Art der Berechnung, Anzahl der Startpositionen des Gitters für jede Kästchengröße Num G, die Menge an maximal möglichen berechneten Boxgrößen (Sizes), die minimale Boxgröße (Min), die maximale Boxgröße (Max) und im Falle der Power Series der Basis-Wert (Base) und Exponent (Exp).

num G bezeichnet hierbei die Anzahl an Start-Positionen des Gitterraster. Sizes bestimmt die Menge an Messungen mit verschiedenen Boxgrößen des Gitterrasters, welche potenziell möglich sind. Im Falle von GR-Nr.1 hat diese Auswirkung auf die Steigerung der Boxgrößen. Im Falle von GR-Nr.2 begrenzt sie die mögliche Menge der Boxgrößen.

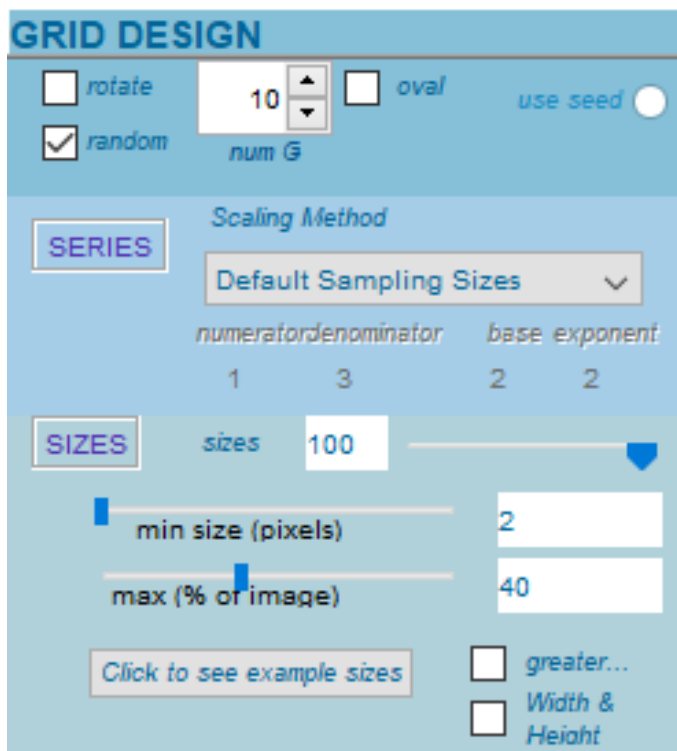


Abbildung 9: Optionsmenü des Gitterrasters in Fraclac für die Standard Box Counting Analyse.

Dargestellt sind die ausgewählten Parameter für GR-Nr.1. Ausgewählt sind „random“, num G = 10, die Skalierungsmethode „Default Sampling Sizes“, Sizes = 100, sowie „min size“ (entspricht Min) = 2 und max (entspricht Max) = 40. Ist Skalierungsmethode „Default Sampling Sizes“ ausgewählt, sind numerator, denominator, base und exponent nicht aktiviert. Nicht ausgewählt sind „rotate“ (Rotation des Gitternetzes), „oval“ (misst das Detail N mittels Ovalen und nicht mittels Kästchen), „greater dim“ (berechnet zusätzlich die image dimension) und „Width & Height“.

Weitere ausgewählte Einstellungen sind „Use Binary“ um Fraclac anzuzeigen, dass ein binäres Bild vorliegt, sowie „Lock white Background“ zur Definition der Hintergrund- (weiße Pixel) und Vordergrundpixel (schwarze Pixel).

Nach Auswahl der genannten Messparameter werden die generierten Abbildungen der Tumor-Stroma-Grenze bzw. Epithel-Stroma-Grenze von Pipeline 1 und Pipeline 2 mittels Fraclac vermessen. Da die D_B je nach Startposition des Gitters variieren kann, wurde, unter den

zahlreichen Parametern, welche sich mit Fraclac berechnen lassen, der Mittelwert aller gemessenen Werte von D_B für jede Gitterposition ($= D_{Bmean}$) als Ergebnisparameter ausgewählt. Das Ziel dieser Wahl war eine weitere Reduktion des Störfaktors der Startposition des Gitters. D_{Bmean} wird aus Zeile 6 der generierten Ergebnistabelle entnommen. Die Ergebniswerte von D_{Bmean} werden in eine Exceltabelle übernommen und ihren Präparat-IDs und klinischen Daten zugeordnet. Zur Unterscheidung des Wertes für D_{Bmean} bezüglich der verwendeten Gitterrastermethodik und der Gewebeart sowie zur erleichterten Handhabung in SPSS werden die berechneten Werte für D_{Bmean} wie folgt bezeichnet:

$t_DB_{scaled} = D_{Bmean}$ eines Tumor-TMAs gemessen mit GR-Nr.1, (t = tumor)

$t_DB_{power} = D_{Bmean}$ eines Tumor-TMAs gemessen mit GR-Nr.2

$n_DB_{scaled} = D_{Bmean}$ eines Normalgewebe-TMAs gemessen mit GR-Nr.1, (n = normal tissue)

$n_DB_{power} = D_{Bmean}$ eines Normalgewebe-TMAs gemessen mit GR-Nr.2.

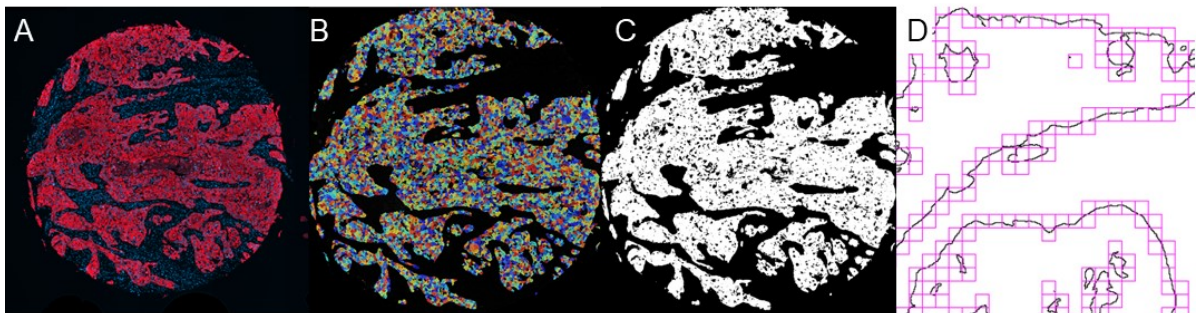


Abbildung 10: Vom mIF-Präparat zur fraktalen Analyse. A ROI eines Tumorschnitts, angefärbt mit immunohistochemischen Markern (DAPI, im Bild blau dargestellt, Pan-Zytokeratin im Bild rot dargestellt); B Overlay der Zeldetektionen des Tumors, generiert mithilfe einer selbstkonstruierten Pipeline in Cellprofiler; C Binäres Bild des Tumors basierend auf der Zeldetektion mit Cellprofiler; D Fraktale Analyse des Umrisses der Tumor-Stromagrenze in Fraclac.

3.7 Statistische Datenauswertung mittels SPSS und Beschreibung der unterschiedlichen Auswertungsprotokolle

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS Statistics 30.0.0.0 (IBM, Armonk, USA). Der Promovierende wurde in der Auswahl der statistischen Tests vom Betreuer dieser Arbeit ██████████ unterstützt und beraten.

Die zugehörigen klinischen Daten der TMAs und gemessenen fraktalen Ergebnisparameter der beiden Datensätze HEso-Squ172Sur-01 und HEso-Squ172Sur-02 wurden in einem Datensatz in Excel zusammengeführt. Initial erfolgte eine visuelle Begutachtung der digitalen Gewebeschnitten in QuPath. Von den 344 digitalen TMAs ($N_{\text{ges}} = 344$) wurden insgesamt 53 Präparate aufgrund genannter Kriterien von der Untersuchung ausgeschlossen. Dabei handelte es sich in der überwiegenden Zahl der Fälle um Schnitte des Normalgewebe des Ösophagus, welche keine ausreichende Menge an Epithelgewebe enthielten oder keine ausreichende Intensität der IF aufweisen konnten. Ein Einschluss dieser Präparate hätte zu einer fehlenden oder unzureichenden Abbildung der Tumor-Stroma- bzw. Epithel-Stroma-Grenze geführt. In der Folge wären digitale Repräsentationen entstanden, welche aufgrund der kleinen Pixelmenge zu verfälschten Werten der gemessenen D_B geführt hätten. Letztendlich wurden die Ergebnisparameter von 291 TMAs ($N_E = 291$) und die klinischen Daten von 179 zugehörigen Patienten (112 TMA-Paare mit identischen Patientendaten + 67 Tumor-TMAs) in die Auswertung aufgenommen.

Bereits während der Digitalisierung hatte jedes TMA eine spezifische ID erhalten. Diese wurde, im Hinblick auf die statistische Auswertung, um eine zusätzliche ganzzahlige Identifikationsnummer ergänzt. Im Falle eines TMAs, welches zu einem der 112 Tumor-Normalgewebe-Paare zugehörig war, wurde noch eine Paar-Nummer zugeordnet. Anschließend erfolgte der Export in SPSS. Wie bereits erwähnt, lag für alle Tumor-TMAs eine Grading-Klasse nach WHO-Klassifikation vor. Für manche Präparate wurde eine Angabe zwischen zwei Grading-Klassen liegend angegeben (bspw. G1-2). Im Vorfeld der Auswertung wurden diese Angaben aufgerundet. Mittels SPSS wurde dann eine deskriptive Statistik dieses Kollektivs erstellt (siehe Tabelle 40 und 41 im Anhang).

Die explorative Auswertung gliedert sich in drei Phasen um die drei zugrundeliegenden Fragestellungen zu beantworten.

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob eine Unterscheidung von Tumorgewebe und Normalgewebe anhand der fraktalen Box-Counting Dimension D_B auf Basis der Morphologie der Tumor-Stroma-Grenze bzw. der Epithel-Stroma-Grenze möglich ist, wurden alle digitalen TMA-Paare eingeschlossen, welche jeweils einen TMA mit Tumorgewebe und einen TMA mit Normalgewebe desselben Patienten enthielten. Alle anderen TMAs wurden nicht in dieses Studiendesign miteingeschlossen. Insgesamt eingeschlossen wurden 112 TMA-Paare ($N_{E1} =$

112). Die ermittelten Werte für D_B wurden dabei in die metrischen Parameter $t_{DB_{scaled}}$ und $n_{DB_{scaled}}$ sowie $t_{DB_{power}}$ und $n_{DB_{power}}$ aufgeteilt, je nachdem ob es das vermessene binäre Bild von einem Tumorpräparat oder von einem Normalgewebepreparat stammt und nach welcher Gitter raster-Methodik vermessen wurde. Anschließend wurden die Parameter der gleichen Gitter raster-Methodik (GR-Nr.1 und GR-Nr.2) von Tumorgewebe und Normalgewebe miteinander verglichen. Bei den TMA-Paaren handelt es sich um verbundene Stichproben, da diese von gleichen Patienten stammten. In der explorativen Datenanalyse konnte nach Testung mittels Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung der Daten nicht sicher angenommen werden, daher wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Handelte es sich um ein signifikantes Ergebnis, wurde im Anschluss noch die Effektstärke nach Cohen (171) berechnet. Die Analyse erfolgte jeweils sowohl für die generierten Bilder der Tumor-Stroma- bzw. Epithel-Stroma-Grenze der Pipeline 1 auf Pan-Zytokeratin-Basis und der Pipeline 2 auf E-Cadherin-Basis.

Bezüglich der Frage, ob eine Unterscheidung der histologischen Grading-Klassen nach WHO-Kriterien mittels der fraktalen Box-Counting Dimension D_B auf Basis der Morphologie der Tumor-Stroma-Grenze beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus möglich ist, wurden $t_{DB_{scaled}}$ und $t_{DB_{power}}$, also die ermittelten Werte der D_B des Tumorgewebes, hinsichtlich eines signifikanten Unterschieds zwischen den histologischen Grading-Klassen (G1-3) untersucht. Es wurden alle TMAs mit Tumorgewebe eingeschlossen. TMAs mit Normalgewebe des Ösophagus wurden ausgeschlossen. Insgesamt eingeschlossen wurden 179 TMAs ($N_{E2} = 179$). Da es sich bei den 3 Grading-Klassen sowie $t_{DB_{scaled}}$ und $t_{DB_{power}}$ um unverbundene Stichproben handelt, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Sofern ein Unterschied festgestellt wurde, erfolgte anschließend, bei Annahme einer Varianzhomogenität nach Durchführung des Levene-Tests und ungleichen Stichproben-Umfängen, eine Post-Hoc-Analyse mittels Dunn-Bonferroni-Test. Handelte es sich um ein signifikantes Ergebnis, wurde im Anschluss noch die Effektstärke nach Cohen (171) berechnet. Die Analyse erfolgte jeweils sowohl für die generierten Bilder der Tumor-Stroma- bzw. Epithel-Stroma-Grenze der Pipeline 1 auf Pan-Zytokeratin-Basis und der Pipeline 2 auf E-Cadherin-Basis.

Um die Frage zu beantworten, ob die fraktale Box-Counting Dimension D_B auf Basis der Morphologie der Tumor-Stroma-Grenze beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ein prognostischer Parameter des Gesamtüberlebens ist, wurde die 179 TMAs ($N_{E2} = 179$) mit Tumorgewebe einer Überlebensanalyse mittels Kaplan-Meier-Kurven unterzogen. Dazu

erfolgt eine Dichotomisierung von t_DB_{scaled} und t_DB_{power} auf der Basis ihres Medians in eine Gruppe von TMAs mit höheren und eine Gruppe mit niedriger ermittelter t_DB_{scaled} und t_DB_{power} . Anschließend erfolgte ein Log-Rank-Test zur Überprüfung, ob in diesem Studiendesign ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Gesamtüberleben vorliegt. Die Analyse erfolgte jeweils für Pipeline 1 auf Pan-Zytokeratin-Basis und Pipeline 2 auf E-Cadherin-Basis.

Das Signifikanzniveau ist bei allen verwendeten Testarten auf $\alpha = 5\%$ festgesetzt. Dementsprechend werden alle Werte mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Die fraktale Dimension D_B als Parameter zur Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe

4.1.1 Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin

Im Folgenden sind die berechneten Werte der fraktalen Box-Counting-Dimension D_B als Mittelwert \pm SE („standard error“) sowie Minimum und Maximum aufgeführt. Weitere Werte der deskriptiven Statistik können Tabelle 10 entnommen werden.

		t_DB_scaled	n_DB_scaled	t_DB_power	n_DB_power
Mittelwert \pm SE		1,546 \pm 0,007	1,283 \pm 0,009	1,309 \pm 0,007	1,124 \pm 0,004
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Unter- grenze	1,533	1,266	1,296	1,116
	Ober- grenze	1,560	1,300	1,323	1,133
5% getrimmtes Mittel		1,549	1,282	1,307	1,122
Median		1,543	1,286	1,293	1,112
Varianz		0,005	0,009	0,005	0,002
Standard Abweichung		0,073	0,093	0,073	0,047
Minimum		1,260	1,091	1,154	1,031
Maximum		1,705	1,568	1,508	1,290
Spannweite		0,445	0,477	0,354	0,259
Interquartilbereich		0,085	0,113	0,098	0,058
Schiefe \pm SE		- 0,579 \pm 0,228	0,101 \pm 0,228	0,445 \pm 0,228	0,705 \pm 0,228
Kurtosis \pm SE		1,674 \pm 0,453	- 0,151 \pm 0,453	- 0,124 \pm 0,453	0,939 \pm 0,453

Tabelle 10: Deskriptive Statistik der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimensionen für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. Dargestellt sind Lagemaße und Streumaße für die Parameter $t_{DB_{scaled}}$ und $n_{DB_{scaled}}$ sowie $t_{DB_{power}}$ und $n_{DB_{power}}$. Alle Werte wurden auf 3 Nachkommastellen gerundet.

In der Auswertung der fraktalen Analyse für Pipeline 1, welche die Tumor-Stroma-Grenze bzw. Parenchym-Stroma auf Basis von Pan-Zytokeratin und DAPI bestimmt hat, zeigt einen für t_DB_{scaled} einen Mittelwert von $1,546 \pm 0,007$ mit einem Minimum von 1,260 und einem Maximum von 1,705, für n_DB_{scaled} $1,283 \pm 0,009$ mit einem Minimum von 1,091 und einem Maximum von 1,568, für t_DB_{power} $1,309 \pm 0,007$ mit einem Minimum von 1,154 und einem Maximum von 1,508 und für n_DB_{power} $1,124 \pm 0,004$ mit einem Minimum von 1,031 und einem Maximum von 1,290. Alle gemessenen Werte, inklusive Ausreißer, liegen zwischen 1,0 und 2,0 und entsprechen daher den erwarteten Werten des geometrischen Äquivalents einer raumfüllenden Kurve unterschiedlicher Komplexität. Dies spricht für eine konsistente Messmethodik sowie für den Ausschluss aller Präparate, welche eine unzureichende Menge an Gewebe bzw. keine ausreichende Intensität der IF aufwiesen und damit nicht ausreichend repräsentative Pixel enthalten. Auffallend sind deutlich niedrigere gemessene Werte mittels GR-Nr. 2 als mittels GR-Nr. 1. Diese Unterschiede sind mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit messtechnischer Art und werden zu einem späteren Zeitpunkt genauer erläutert. Auch wenn es deutliche Mittelwerts-Unterschiede zwischen den Werten für D_B zwischen Tumor- und Normalgewebe gibt und sich deren Konfidenzintervalle nicht überlagern, so gibt es dennoch Überschneidungen zwischen Tumor- D_B und Normalgewebe- D_B für beide Gitterrastermethodiken.

Die Darstellung der Parameter mittels Boxplots (Abbildung 11) veranschaulicht bereits einen Unterschied des Medians zwischen t_DB_{scaled} und n_DB_{scaled} sowie t_DB_{power} und n_DB_{power} . Schiefe und Kurtosis sprachen in erster Näherung gegen eine Normalverteilung der Daten. Die Durchführung des Shapiro-Wilk-Tests zur Prüfung der Normalverteilung der Daten zeigte für t_DB_{scaled} und n_DB_{power} einen p-Wert $< 0,05$, sodass nicht von der Normalverteilung der Daten ausgegangen werden muss. Für n_DB_{scaled} und t_DB_{power} kann von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden (siehe Tabelle 11).

		t_DB_ scaled	n_DB_ scaled	t_DB_ power	n_DB_ power
Shapiro-Wilk	Statistik	0,971	0,985	0,977	0,972
	df	112	112	112	112
	Signifikanz	0,015	0,235	0,052	0,017

Tabelle 11: Testung auf Normalverteilung für die Parameter t_DB_scaled , n_DB_scaled , t_DB_power , n_DB_power für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.

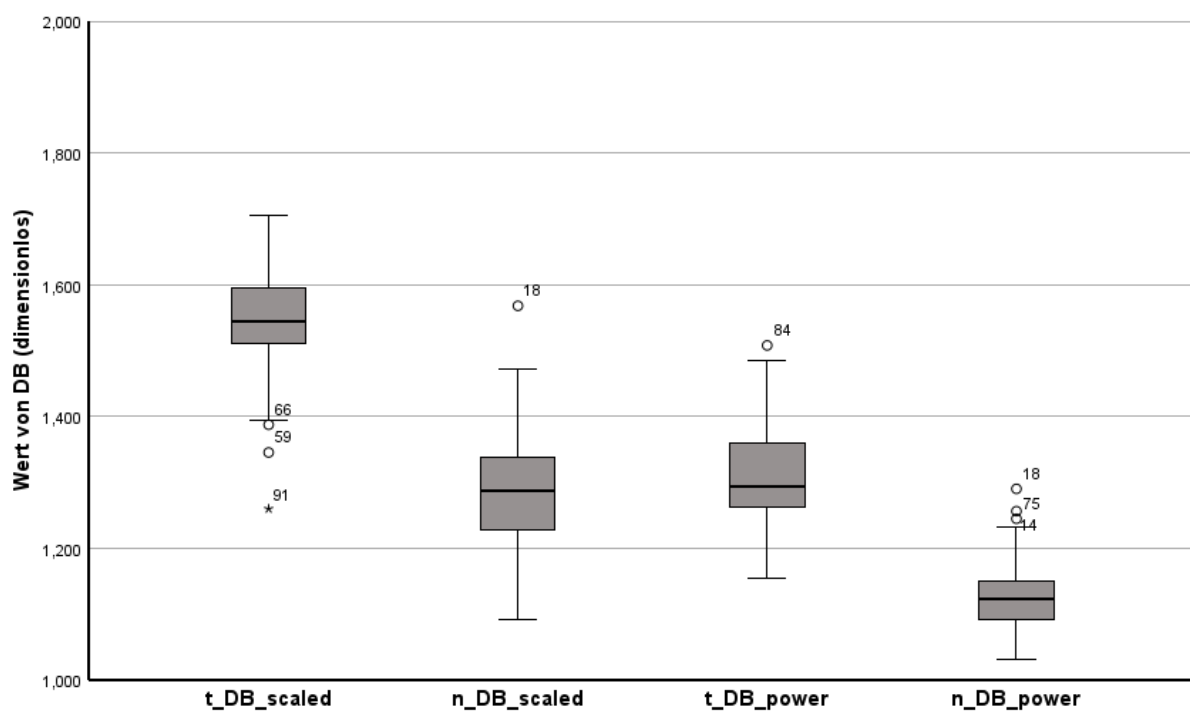


Abbildung 11: Boxplots für die Parameter t_DB_scaled , n_DB_scaled , t_DB_power , n_DB_power für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. Parameter mit dem Präfix t repräsentieren hierbei die ermittelte D_B des Tumorgewebes. Parameter mit dem Präfix n repräsentieren die ermittelte D_B des Normalgewebes. Insgesamt erkennt man einen deutlichen Unterschied des Medians (t_DB_scaled - n_DB_scaled 1,543 zu 1,286; t_DB_power , n_DB_power 1,293 zu 1,112) zwischen Tumor- D_B und Normalgewebe- D_B . Zudem zeigen Parameter, welche mit GR-Nr. 1 ermittelt wurden, höhere Werte als Parameter, welche mit GR-Nr. 2 ermittelt wurden.

Da immer ein Parameter keine Normalverteilung zeigte, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für abhängige Stichproben bezüglich der Unterscheidung von t_DB_scaled und n_DB_scaled sowie t_DB_power und n_DB_power durchgeführt (siehe Tabelle 12).

	n_DB_scaled - t_DB_scaled			n_DB_power - t_DB_power		
	N	Mittlerer Rang	Rangsumme	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Negative Ränge	108 ^a	57,41	6200,00	110 ^d	57,47	6322,00
Positive Ränge	3 ^b	5,33	16,00	2 ^e	3,00	6,00
Bindungen	1 ^c			0 ^f		
Gesamt	112			112		

Tabelle 12: Wilcoxon-Rangsummen-Test für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. a. $n_{DB_scaled} < t_{DB_scaled}$; b. $n_{DB_scaled} > t_{DB_scaled}$; c. $n_{DB_scaled} = t_{DB_scaled}$; d. $n_{DB_power} < t_{DB_power}$; e. $n_{DB_power} > t_{DB_power}$. f. $n_{DB_power} = t_{DB_power}$.

Nach Durchführung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test muss die Alternativhypothese angenommen werden. Die gemessene fraktale Box-Counting-Dimension D_B von Tumorgewebe und Normalgewebe unterscheidet sich damit in der zentralen Tendenz signifikant voneinander. Dabei sind die Werte des Tumorgewebes für D_B im Mittel höher als für das Normalgewebe. Dies gilt sowohl für die Messung nach Methodik GR-Nr.1 (asymptotischer Wilcoxon-Test für $n_{DB_scaled} - t_{DB_scaled}$: z-Wert = -9,098, $p < 0,001$, n (Stichprobengröße) = 112) als auch für die Messung nach Methodik GR-Nr.2 (asymptotischer Wilcoxon-Test für $n_{DB_power} - t_{DB_power}$: z-Wert = -9,168, $p < 0,001$, $n = 112$). Die Effektstärke r beträgt für $n_{DB_scaled} - t_{DB_scaled}$ $r = 0,86$ und für $n_{DB_power} - t_{DB_power}$ $r = 0,87$ und entspricht nach Cohen (171) einem großen Effekt.

4.1.2 Pipeline 2 – E-Cadherin

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich für die E-Cadherin-basierte Pipeline 2 (siehe Tabelle 13). Konkret wiesen t_{DB_scaled} einen Mittelwert von $1,596 \pm 0,008$ mit einem Minimum von 1,306 und einem Maximum von 1,731, für n_{DB_scaled} $1,399 \pm 0,013$ mit einem Minimum von 1,125 und einem Maximum von 1,712, für t_{DB_power} $1,422 \pm 0,008$ mit einem Minimum von 1,182 und einem Maximum von 1,596 und für n_{DB_power} $1,314 \pm 0,010$ mit einem Minimum von 1,069 und einem Maximum von 1,567. Auch in die gemessenen Werte dieser Messreihe, liegen, inklusive Ausreißer, zwischen 1,0 und 2,0 und sind damit plausibel.

		t_DB_scaled	n_DB_scaled	t_DB_power	n_DB_power
Mittelwert ± SE		1,596 ± 0,008	1,399 ± 0,013	1,422 ± 0,008	1,314 ± 0,010
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Unter- grenze	1,581	1,374	1,406	1,294
	Ober- grenze	1,611	1,424	1,437	1,333
5% getrimmtes Mittel		1,601	1,398	1,423	1,314
Median		1,607	1,414	1,430	1,325
Varianz		0,007	0,018	0,007	0,011
Standard Abweichung		0,081	0,134	0,081	0,105
Minimum		1,306	1,125	1,182	1,069
Maximum		1,731	1,712	1,596	1,567
Spannweite		0,425	0,587	0,414	0,497
Interquartilbereich		0,099	0,180	0,110	0,133
Schiefe ± SE		- 1,118 ± 0,228	- 0,141 ± 0,228	- 0,269 ± 0,228	- 0,261 ± 0,228
Kurtosis ± SE		1,860 ± 0,453	- 0,255 ± 0,453	- 0,008 ± 0,453	0,005 ± 0,453

Tabelle 13: Deskriptive Statistik der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimensionen für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 2 - E-Cadherin. Dargestellt sind Lagemaße und Streumaße für die Parameter $t_{DB_{scaled}}$ und $n_{DB_{scaled}}$ sowie $t_{DB_{power}}$ und $n_{DB_{power}}$. Alle Werte wurden auf 3 Nachkommastellen gerundet.

Auch in Pipeline 2 zeigen sich Unterschiede in der Höhe des Wertes der ermittelten D_B in Abhängigkeit der verwendeten Gitter raster-Methodik. Zudem fällt im Vergleich mit den Ergebnissen von Pipeline 1 auf, dass die ermittelten Mittelwerte von D_B des Normalgewebes in der E-Cadherin-basierten Pipeline 2 deutlich höher liegen als in der Pan-Zytokeratin-basierten Pipeline 1 ($n_{DB_{scaled}}$ und $n_{DB_{power}}$). Dieser Unterschied zeigt sich im Vergleich der Pipelines mit den ermittelten Werten von D_B des Tumorgewebes ($t_{DB_{scaled}}$ und $t_{DB_{power}}$) deutlich schwächer ausgeprägt. Eine Erklärungsansatz hierfür wäre bspw. eine unterschiedliche Repräsentation der Epithel-Stroma-Grenze des Normalgewebes durch die Marker Pan-Zytokeratin und E-Cadherin. Ein anderer Ansatz wäre ein systematischer Fehler oder Zufallsfehler der Messmethode. Auch die Darstellung der Parameter der Pipeline 2 mittels

Boxplots (siehe Abbildung 12) veranschaulicht einen Unterschied des Medians zwischen $t_{DB_{scaled}}$ und $n_{DB_{scaled}}$ sowie $t_{DB_{power}}$ und $n_{DB_{power}}$.

Die Durchführung des Shapiro-Wilk-Tests zur Prüfung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk ergab, mit Ausnahme von $t_{DB_{power}}$, für $t_{DB_{scaled}}$, $n_{DB_{scaled}}$ und $n_{DB_{power}}$ einen p-Wert $< 0,05$, sodass nicht von der Normalverteilung der Daten ausgegangen werden muss (siehe Tabelle 14).

		$t_{DB_{scaled}}$	$n_{DB_{scaled}}$	$t_{DB_{power}}$	$n_{DB_{power}}$
Shapiro-Wilk	Statistik	0,933	0,976	0,988	0,976
	df	112	112	112	112
	Signifikanz	$< 0,001$	0,041	0,408	0,041

Tabelle 14: Testung auf Normalverteilung für die Parameter $t_{DB_{scaled}}$, $n_{DB_{scaled}}$, $t_{DB_{power}}$, $n_{DB_{power}}$ für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors.

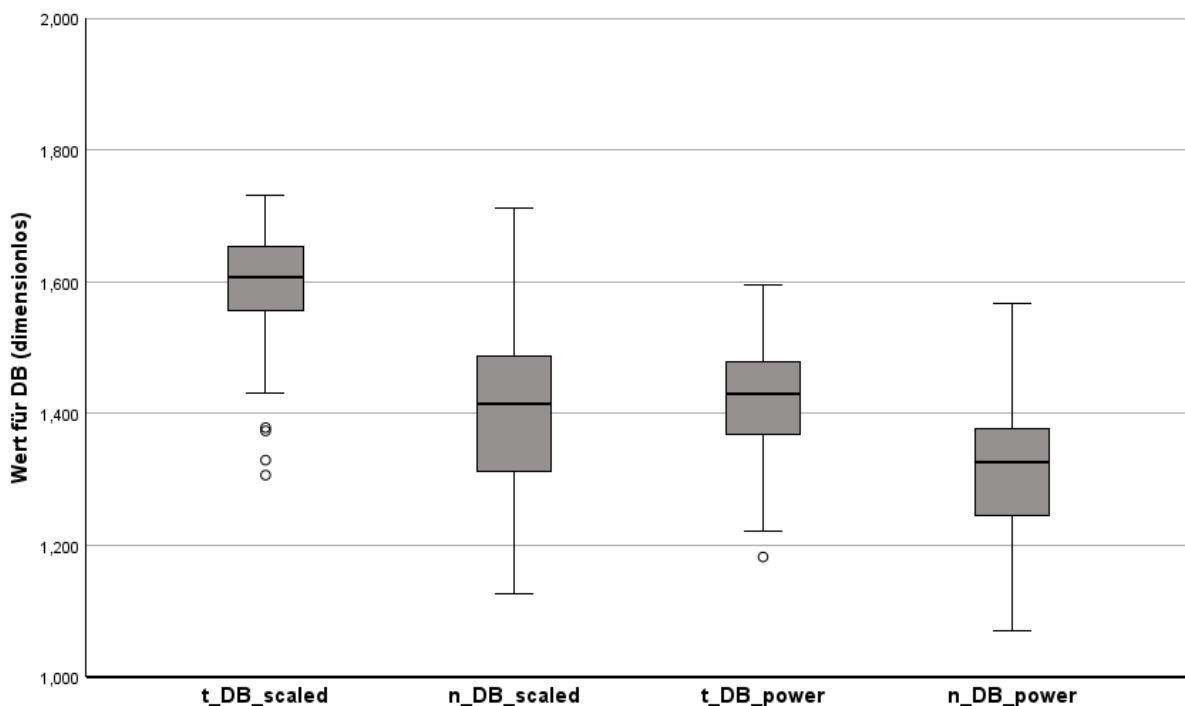


Abbildung 12: Boxplots für die Parameter $t_{DB_{scaled}}$, $n_{DB_{scaled}}$, $t_{DB_{power}}$, $n_{DB_{power}}$ für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.

Unter der Berücksichtigung der Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests (siehe Tabelle 15) unterscheiden sich die gemessene fraktale Box-Counting-Dimension D_B von Tumorgewebe und Normalgewebe auch in der E-Cadherin basierten Pipeline in der zentralen Tendenz signifikant voneinander. Dies gilt erneut sowohl für die Messung nach Methodik GR-Nr.1 (asymptotischer Wilcoxon-Test für $n_{DB_{scaled}} - t_{DB_{scaled}}$: z-Wert = -8,210, $p < 0,001$, $n = 112$) als auch für die Messung nach Methodik GR-Nr.2 (asymptotischer Wilcoxon-Test für $n_{DB_{power}} - t_{DB_{power}}$: z-Wert = -6,663, $p < 0,001$, $n = 112$).

Die Effektstärke r beträgt für $n_{DB_{scaled}} - t_{DB_{scaled}}$ $r = 0,76$ und für $n_{DB_{power}} - t_{DB_{power}}$ $r = 0,63$ und entspricht nach Cohen (171) einem großen Effekt.

	n_DB_scaled - t_DB_scaled			n_DB_power - t_DB_power		
	N	Mittlerer Rang	Rangsumme	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Negative Ränge	101 ^a	59,33	5992,00	90 ^d	60,66	5459,00
Positive Ränge	11 ^b	30,55	336,00	22 ^e	39,50	869,00
Bindungen	0 ^c	-	-	0 ^f	-	-
Gesamt	112	-	-	112	-	-

Tabelle 15: Wilcoxon-Rangsummen-Test für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E1}) in der Pipeline 2 - E-Cadherin. a. $n_{DB_{scaled}} < t_{DB_{scaled}}$; b. $n_{DB_{scaled}} > t_{DB_{scaled}}$; c. $n_{DB_{scaled}} = t_{DB_{scaled}}$; d. $n_{DB_{power}} < t_{DB_{power}}$; e. $n_{DB_{power}} > t_{DB_{power}}$. f. $n_{DB_{power}} = t_{DB_{power}}$.

4.2 Die fraktale Dimension D_B als Parameter zur Unterscheidung des Tumor-Grading

4.2.1 Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin

Für die Pan-Zytokeratin-basierte Pipeline 1 im Kollektiv (N_{E2}) zeigten sich für $t_{DB_{scaled}}$ ($1,545 \pm 0,006$) und $t_{DB_{power}}$ ($1,310 \pm 0,005$) ähnliche Mittelwerte und Standardfehler wie

für N_{E1} (siehe Tabelle 16). Alle ermittelten Werte für t_{DB_scaled} und t_{DB_power} liegen zwischen 1,0 und 2,0 und sind damit plausibel.

		t_{DB_scaled}	t_{DB_power}
Mittelwert \pm SE		1,545 \pm 0,006	1,310 \pm 0,005
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Unter- grenze	1,534	1,299
	Ober- grenze	1,557	1,321
5% getrimmtes Mittel		1,550	1,308
Median		1,549	1,299
Varianz		0,006	0,005
Standard Abweichung		0,076	0,073
Minimum		1,250	1,154
Maximum		1,705	1,508
Spannweite		0,455	0,354
Interquartilbereich		0,092	0,098
Schiefe \pm SE		- 0,905 \pm 0,182	0,365 \pm 0,182
Kurtosis \pm SE		2,172 \pm 0,361	- 0,222 \pm 0,361

Tabelle 16: Deskriptive Statistik der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimensionen t_{DB_scaled} und t_{DB_power} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. Dargestellt sind Lagemaße und Streumaße für die Parameter t_{DB_scaled} und t_{DB_power} . Alle Werte wurden auf 3 Nachkommastellen gerundet.

Sowohl für t_{DB_scaled} als auch für t_{DB_power} musste die Nullhypothese zur Normalverteilung abgelehnt werden (siehe Tabelle 17).

		t_{DB_scaled}	t_{DB_power}
Shapiro-Wilk	Statistik	0,952	0,982
	df	179	179
	Signifikanz	< 0,001	0,024

Tabelle 17: Teststatistik auf Normalverteilung für die Parameter t_{DB_scaled} und t_{DB_power} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.

Nachfolgend wurde der Levene-Test zur Prüfung der Varianzhomogenität durchgeführt. Hier konnte die Nullhypothese zur Varianzhomogenität (siehe Tabelle 18) für alle Parameter angenommen werden.

t_{DB_scaled}				t_{DB_power}				
Basiert auf	Mittelwert	Median	Median & angepassten df	Getrimmten Mittel	Mittelwert	Median	Median & angepassten df	Getrimmten Mittel
Levene-Statistik	2,084	1,093	1,093	1,586	2,267	1,899	1,899	2,198
df1	2	2	2	2	2	2	2	2
df2	176	176	137,183	176	176	176	163,383	176
Sig.	0,127	0,338	0,338	0,208	0,107	0,153	0,153	0,114

Tabelle 18: Levene-Teststatistik zur Prüfung der Varianzhomogenität der Parameter t_{DB_scaled} und t_{DB_power} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.

Der Kruskal-Wallis-Test zeigt sowohl für t_{DB_scaled} (asymptotische Signifikanz $p = 0,030$) als auch t_{DB_power} (asymptotische Signifikanz $p = 0,026$) einen Unterschied bzgl. der zentralen Tendenzen der Dimension D_B zwischen den Grading-Klassen (siehe Tabelle 19 und 20).

Grading-Klassen kodiert	t_DB_scaled		t_DB_power	
	N	Mittlerer Rang	N	Mittlerer Rang
1	55	95,67	55	89,30
2	103	82,32	103	84,64
3	21	112,81	21	118,12
Gesamt	179		179	

Tabelle 19: Ränge des Kruskal-Wallis-Test der Parameter t_DB_scaled und t_DB_power in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.

	t_DB_scaled	t_DB_power
Kruskal-Wallis-H	6,991 ^a	7,296 ^a
df	2	2
Asymp. Sig.	0,030 ^b	0,026 ^b

Tabelle 20: Teststatistiken des Kruskal-Wallis-Test der Parameter t_DB_power und t_DB_scaled in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.

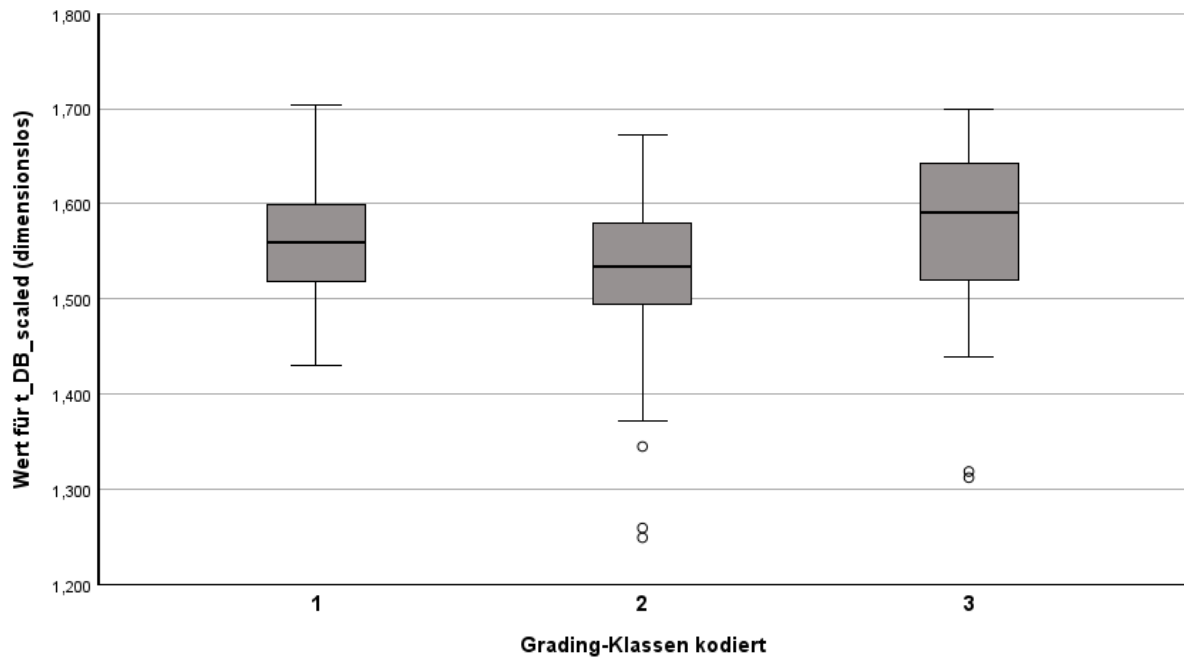


Abbildung 13: Boxplots für den Parameter t_{DB_scaled} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin

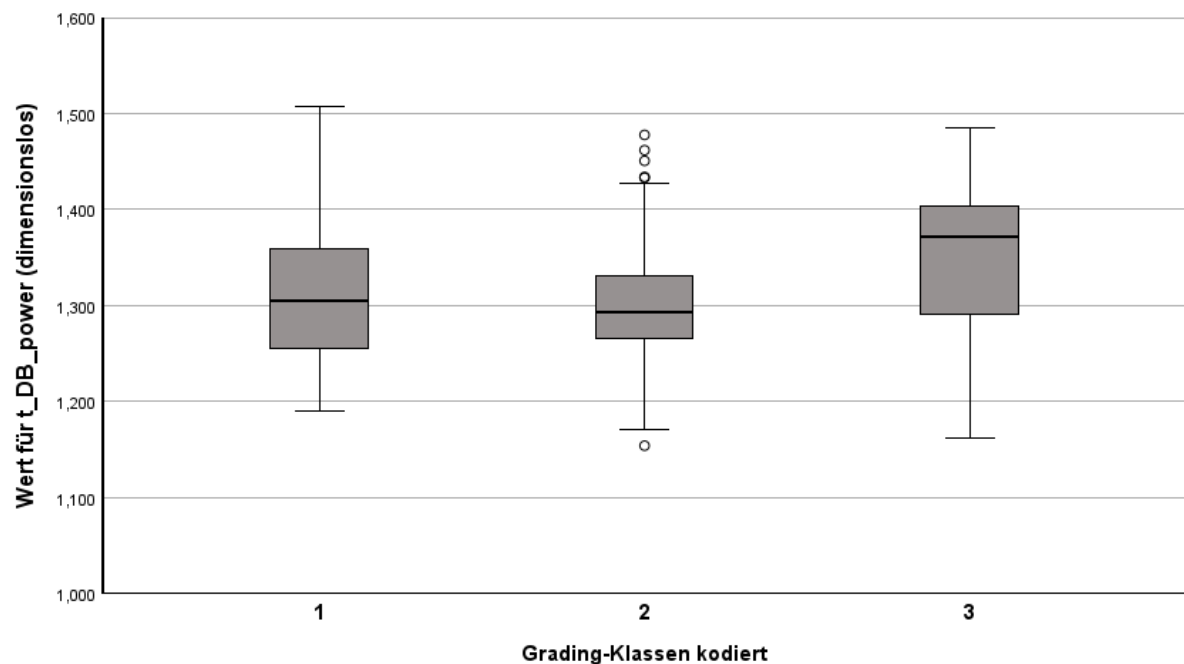


Abbildung 14: Boxplots für den Parameter t_{DB_power} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin.

Ein im Anschluss durchgeführte Post-Hoc-Analyse mit Bonferroni-Korrektur zeigt, dass sich sowohl für t_{DB_scaled} ($z = -2,457$, $p = 0,042$) als auch für t_{DB_power} ($z = -2,698$, $p = 0,021$) lediglich die Grading-Klassen 2 und 3 signifikant unterscheiden (siehe Tabelle 21 und 22). Gemäß der ermittelten Effektstärke r (r für $t_{DB_scaled} = 0,22$; r für $t_{DB_power} = 0,24$) handelt es sich allerdings um einen schwachen Effekt nach Cohen (171).

Stichprobe 1 - Stichprobe 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik z	Sig.	Anp. Sig. ^a
2-1	13,352	8,654	1,543	0,123	0,369
2-3	-30,489	12,407	-2,457	0,014	0,042
1-3	-17,137	13,292	-1,289	0,197	0,592

Tabelle 21: Ergebnisse der Post Hoc-Analyse im paarweisen Vergleich der Grading-Klassen für den Parameter t_{DB_scaled} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050. a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

Stichprobe 1 -Stichprobe 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik z	Sig.	Anp. Sig. ^a
2-1	4,659	8,654	0,538	0,590	1,000
2-3	-33,478	12,407	-2,698	0,007	0,021
1-3	-28,819	13,292	-2,168	0,030	0,090

Tabelle 22: Ergebnisse der Post Hoc-Analyse zum paarweisen Vergleich der Grading-Klassen für den Parameter t_{DB_power} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050. a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

4.2.2 Pipeline 2 – E-Cadherin

Für die E-Cadherin-basierte Pipeline 2 im Kollektiv (N_{E2}) zeigten sich für t_{DB_scaled} ($1,592 \pm 0,006$) und t_{DB_power} ($1,417 \pm 0,006$) ähnliche Mittelwerte und Standardfehler wie für N_{E1} (siehe Tabelle 23). Alle ermittelten Werte für t_{DB_scaled} und t_{DB_power} liegen zwischen 1,0 und 2,0 und sind damit plausibel.

		t_DB_scaled	t_DB_power
Mittelwert ± SE		1,592 ± 0,006	1,417 ± 0,006
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Unter- grenze	1,579	1,405
	Ober- grenze	1,604	1,429
5% getrimmtes Mittel		1,599	1,419
Median		1,606	1,423
Varianz		0,007	0,006
Standard Abweichung		0,085	0,080
Minimum		1,224	1,163
Maximum		1,731	1,596
Spannweite		0,507	0,433
Interquartilbereich		0,094	0,103
Schiefe ± SE		- 1,536 ± 0,182	- 0,416 ± 0,182
Kurtosis ± SE		3,321 ± 0,361	0,206 ± 0,361

Tabelle 23: Deskriptive Statistik der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimensionen $t_{DB_{scaled}}$ und $t_{DB_{power}}$ für das Kollektiv der gepaarten TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin. Dargestellt sind Lagemaße und Streumaße für die Parameter $t_{DB_{scaled}}$ und $t_{DB_{power}}$. Alle Werte wurden auf 3 Nachkommastellen gerundet.

		t_DB_scaled	t_DB_power
Shapiro-Wilk	Statistik	0,887	0,987
	df	179	179
	Signifikanz	< 0,001	0,104

Tabelle 24: Teststatistik auf Normalverteilung für die Parameter $t_{DB_{scaled}}$ und $t_{DB_{power}}$ für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.

	t_DB_scaled				t_DB_power			
Basiert auf	Mittelwert	Median	Median & angepassten df	Getrimmten Mittel	Mittelwert	Median	Median & angepassten df	Getrimmten Mittel
Levene-Statistik	1,724	1,276	1,276	1,370	0,834	0,678	0,678	0,859
df1	2	2	2	2	2	2	2	2
df2	176	176	149,018	176	176	176	171,817	176
Sig.	0,181	0,282	0,282	0,257	0,436	0,509	0,509	0,425

Tabelle 25: Levene-Teststatistik zur Prüfung der Varianzhomogenität für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.

Während sich für t_DB_scaled keine Normalverteilung der Daten (siehe Tabelle 24) zeigte, konnte dies für t_DB_power angenommen werden. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Auswertung wurde jedoch für beide Parameter ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Nachfolgend wurde erneut der Levene-Test zur Prüfung der Varianzhomogenität durchgeführt. Hier konnte die Nullhypothese zur Varianzhomogenität (siehe Tabelle 25) für alle Parameter angenommen werden.

Der Kruskal-Wallis-Test zeigt für t_DB_scaled (asymptotische Signifikanz $p = 0,016$) einen Unterschied bzgl. der zentralen Tendenzen der Dimension D_B zwischen den Grading-Klassen. Für t_DB_power (asymptotische Signifikanz $p = 0,336$) hingegen zeigte der Kruskal-Wallis-Test keinen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 26 und 27).

	t_DB_scaled		t_DB_power	
Grading-Klassen kodiert	N	Mittlerer Rang	N	Mittlerer Rang
1	52	106,03	52	98,94
2	106	81,19	106	86,30
3	21	94,79	21	86,55
Gesamt	179		179	

Tabelle 26: Ränge des Kruskal-Wallis-Test der Variablen t_DB-scaled und t_DB_power in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2- E-Cadherin.

	t_DB_scaled	t_DB_power
Kruskal-Wallis-H	8,220	2,183
df	2	2
Asymp. Sig.	0,016	0,336

Tabelle 27: Teststatistiken des Kruskal-Wallis-Test der Parameter t_{DB_power} und t_{DB_scaled} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.

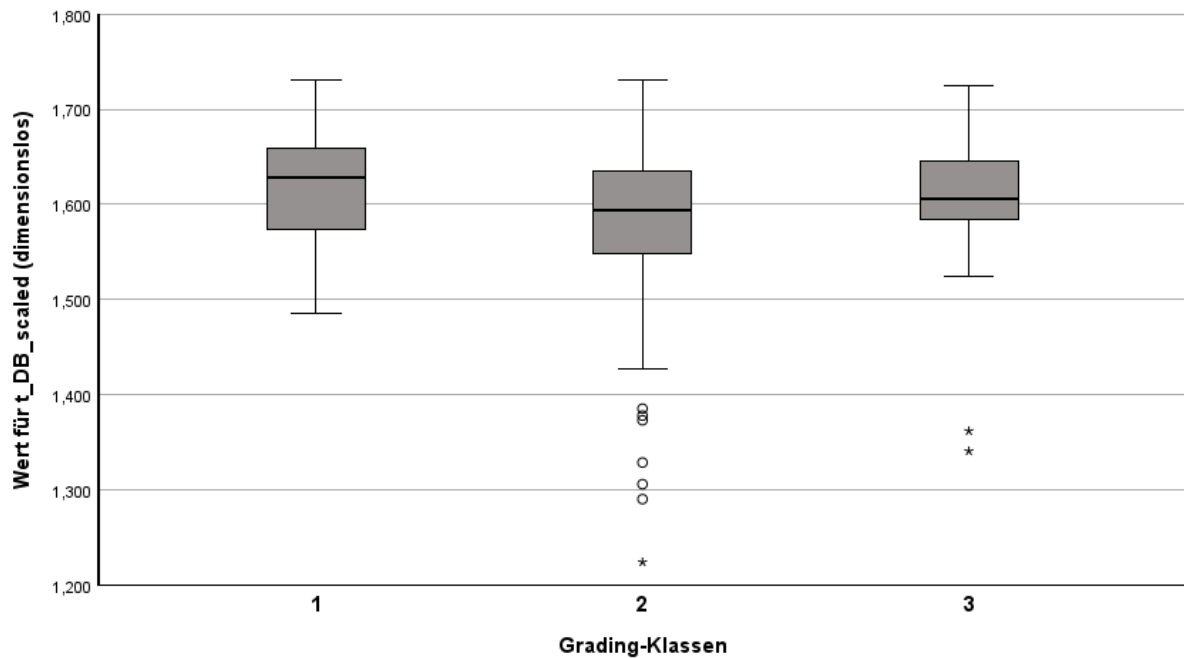


Abbildung 15: Boxplots für den Parameter t_{DB_scaled} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.

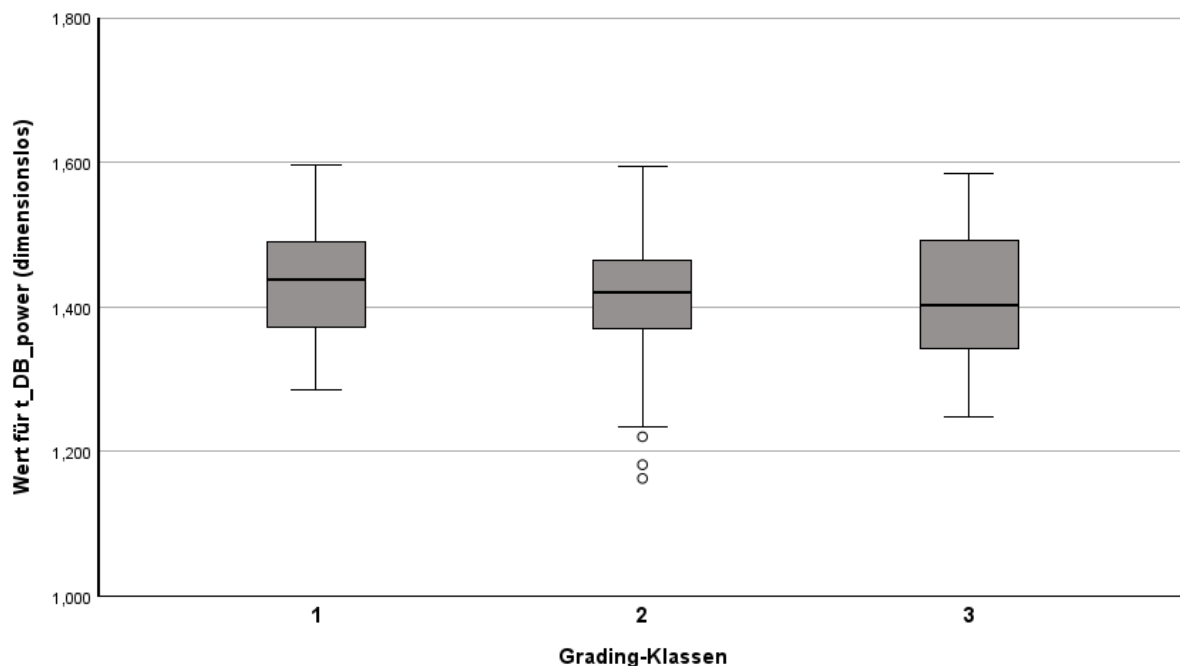


Abbildung 16: Boxplots für den Parameter t_{DB_power} in Abhängigkeit der Grading-Klassen für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin.

Für t_{DB_scaled} wurde eine Post-Hoc-Analyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Diesmal zeigte sich, dass sich lediglich die Gradingklassen 1 und 2 signifikant unterscheiden ($z = 2,831$; $p = 0,014$; siehe Tabelle 28). Gemäß der ermittelten Effektstärke r für t_{DB_scaled} ($r = 0,25$) handelt es sich ebenfalls um einen schwachen Effekt nach Cohen (171).

Stichprobe 1 - Stichprobe 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardtest-statistik z	Sig.	Anp. Sig. ^a
2-3	-13,597	12,377	-1,099	0,272	0,816
2-1	24,840	8,773	2,831	0,005	0,014
3-1	11,243	13,397	0,839	0,401	1,000

Tabelle 28: Ergebnisse der Post Hoc-Analyse im paarweisen Vergleich der Grading-Klassen für den Parameter t_{DB_scaled} für das Kollektiv der Tumor-TMAs (N_{E2}) in der Pipeline 2 – E-Cadherin. Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050. a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

4.3 Überlebensanalyse – Prognostische Bedeutung der fraktalen Dimension D_B im Hinblick auf das Gesamtüberleben beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

4.3.1 Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin

Zur Durchführung der Überlebenszeit-Analyse mittels Überlebensanalyse wurden die Parameter t_{DB_scaled} und t_{DB_power} für das Kollektiv (N_{E2}) anhand ihres Medians als Grenzwert dichotomisiert. Tabelle 29 und Tabelle 30 stellen die Fallverarbeitung nach Klassierung dar. Als Einschränkungen der Überlebenszeitanalyse ist zu erwähnen, dass das untersuchte Kollektiv (N_{E2}) insgesamt eine große Anzahl an zensierten Daten (55,3%) beinhaltet. Zudem sind in der Gruppe, welche die Werte von D_B kleiner des Medians beinhaltet, zum Ende des Nachbeobachtungszeitraums weniger als 50 % der Patienten verstorben. Daher ist eine Ermittlung der medianen Überlebenszeit dieser Gruppe nicht möglich und es wird stattdessen die durchschnittliche (mittlere) Überlebenszeit angegeben, auch wenn diese fehlerbehafteter als der Median sein kann.

t_{DB_scaled} (Klassiert)	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen	Zensiert	
			N	Prozent
< Median	90	36	54	60,0%
> Median	89	44	45	50,6%
Gesamt	179	80	99	55,3%

Tabelle 29: Zusammenfassung der Fallverarbeitung nach Klassierung von t_{DB_scaled} anhand des Medians in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. Dargestellt ist die Gesamtzahl der Fälle, welche jeweils in die zwei Klassen (< Median, > Median) eingruppiert wurden. Zudem zeigt sich die Anzahl der Ereignisse sowie die zensierten Fälle in Absolut-Zahlen und in Prozent im Verhältnis der Gesamtzahl.

t_DB_power (Klassiert)	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen	Zensiert	
			N	Prozent
< Median	90	37	53	58,9%
> Median	89	43	46	51,7%
Gesamt	179	80	99	55,3%

Tabelle 30: Zusammenfassung der Fallverarbeitung nach Klassierung von t_DB_power anhand des Medians in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. Dargestellt ist die Gesamtzahl der Fälle, welche jeweils in die zwei Klassen (< Median, > Median) eingruppiert wurden. Zudem zeigt sich die Anzahl der Ereignisse sowie die zensierten Fälle in Absolut-Zahlen und in Prozent im Verhältnis der Gesamtzahl.

Der Schätzer der mittleren Überlebenszeit für die D_B ermittelt nach GR-Nr.1 (t_DB_scaled) für die Gruppe < Median vs. > Median beträgt 35,0 vs. 31,1 Monate. Es liegt eine Überschneidung der Konfidenzintervalle (siehe Tabelle 31) vor. Ein ähnlicher Sachverhalt zeigt sich für den Schätzer der mittleren Überlebenszeit für die D_B ermittelt nach GR-Nr.2 (t_DB_power). Dieser liegt für die Gruppe < Median vs. > Median bei 34,5 vs. 31,6 Monate. Auch hier überlagern sich die Konfidenzintervalle (Tabelle 32) deutlich.

t_DB_ scaled (Klassiert)	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	Standard- fehler	95%-Konfidenz- intervall		Schätzer	Standard- fehler	95%-Konfidenz- intervall	
			Unter- grenze	Ober- grenze			Unter- grenze	Ober- grenze
1	34,998	2,200	30,685	39,310	-	-	-	-
2	31,142	2,238	26,755	35,529	29,000	7,624	14,058	43,942
Gesamt	33,116	1,575	30,030	36,203	41,000	-	-	-

Tabelle 31: Auflistung der mittleren und medianen Überlebenszeiten für t_DB_scaled klassiert anhand des Medians in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

t_DB_ power (Klassiert)	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	Standard- fehler	95%-Konfidenz- intervall		Schätzer	Standard- fehler	95%-Konfidenz- intervall	
			Unter- grenze	Ober- grenze			Unter- grenze	Ober- grenze
1	34,490	2,220	30,140	38,841	-	-	-	-
2	31,630	2,230	27,260	36,000	31,000	8,307	14,719	47,281
Gesamt	33,116	1,575	30,030	36,203	41,000	.	.	.

Tabelle 32: Auflistung der mittleren und medianen Überlebenszeiten für t_DB_power klassiert anhand des Medians in der Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Sowohl visuell in den dargestellten Überlebenskurven (siehe Abbildung 17) als auch im durchgeführten Log-Rank-Test zeigt sich weder für t_DB_scaled (Chi-Quadrat = 1,429; p = 0,232) als auch für t_DB_power (Chi-Quadrat = 0,819; p = 0,366) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Damit wird die Nullhypothese, welche von keinem Zusammenhang zwischen der Höhe des Wertes für D_B und den Überlebenszeiten der Patienten ausgeht, beibehalten.

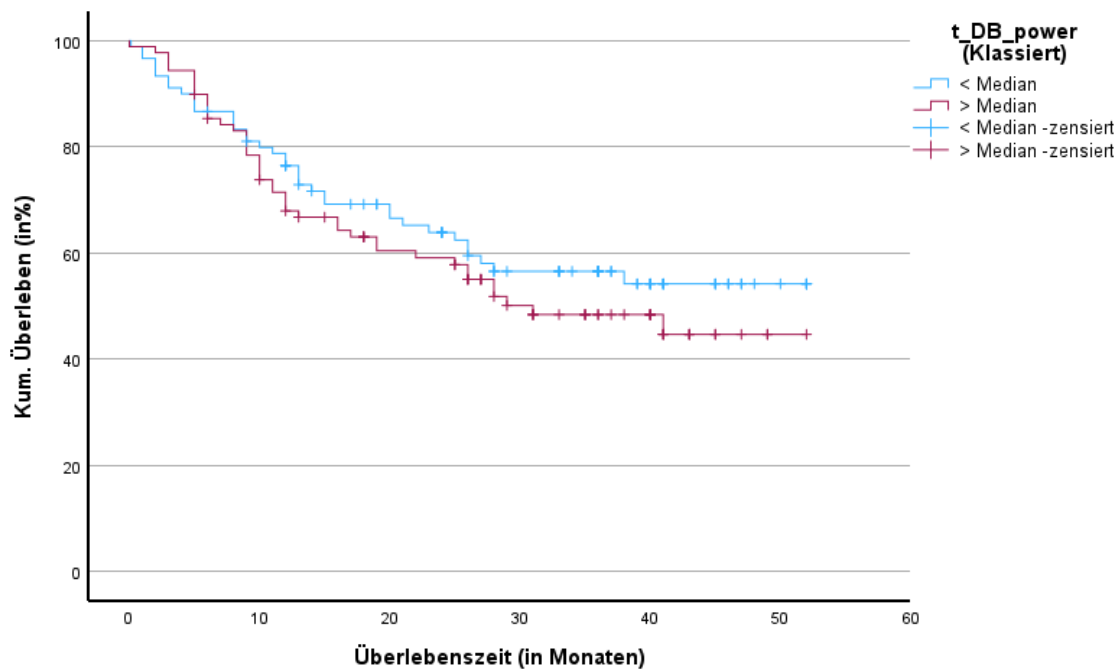
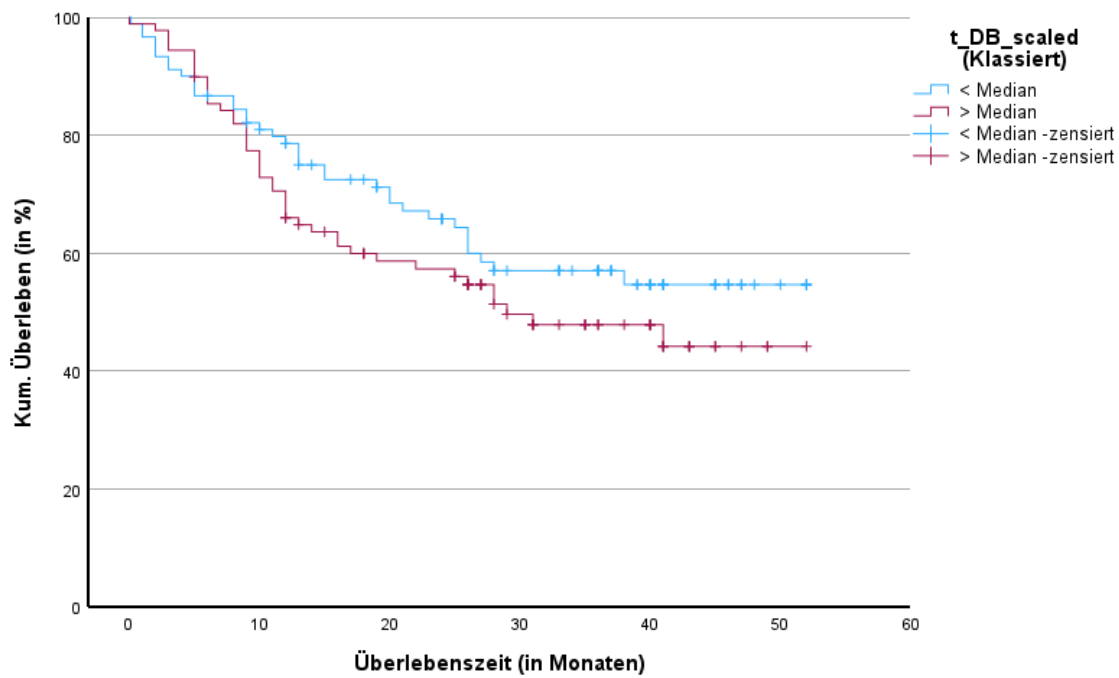


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven zur Überlebenszeit des Kollektivs (N_{E2}) in Abhängigkeit der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimension t_{DB_scaled} (obere Grafik) und t_{DB_power} (untere Grafik) für die Pipeline 1 – Pan-Zytokeratin. Auf der Y-Achse ist das kumulative Überleben in Prozent, auf der X-Achse die Gesamtüberlebenszeit in Monaten angegeben. Mittels der blauen Kurve wird die Patientengruppe mit einer D_B kleiner des Medians, mittels der roten Kurve die Patientengruppe mit einer D_B dargestellt. Senkrechte Linien im Graphen zeigen zensierte Daten. Insgesamt zeigt sich ein sehr ähnlicher Verlauf beider Kurven.

4.3.2 Pipeline 2 – E-Cadherin

Auch für die E-Cadherin basierten Messungen wurden die Parameter t_{DB_scaled} und t_{DB_power} für das Kollektiv (N_{E2}) anhand ihres Medians als Grenzwert dichotomisiert. Tabelle 33 und Tabelle 34 stellen deren Fallverarbeitung nach Klassierung dar.

t_{DB_scaled} (Klassiert)	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen	Zensiert	
			N	Prozent
< Median	89	42	47	52,8%
> Median	90	38	52	57,8%
Gesamt	179	80	99	55,3%

Tabelle 33: Zusammenfassung der Fallverarbeitung nach Klassierung von t_{DB_scaled} anhand des Medians in der Pipeline 2 – E-Cadherin. Dargestellt ist die Gesamtzahl der Fälle, welche jeweils in die zwei Klassen (< Median, > Median) eingruppiert wurden. Zudem zeigt sich die Anzahl der Ereignisse sowie die zensierten Fälle in Absolut-Zahlen und in Prozent im Verhältnis der Gesamtzahl.

t_{DB_power} (Klassiert)	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen	Zensiert	
			N	Prozent
< Median	90	43	47	52,2%
> Median	89	37	52	58,4%
Gesamt	179	80	99	55,3%

Tabelle 34: Zusammenfassung der Fallverarbeitung nach Klassierung von t_{DB_power} anhand des Medians in der Pipeline 2 – E-Cadherin. Dargestellt ist die Gesamtzahl der Fälle, welche jeweils in die zwei Klassen (< Median, > Median) eingruppiert wurden. Zudem zeigt sich die Anzahl der Ereignisse sowie die zensierten Fälle in Absolut-Zahlen und in Prozent im Verhältnis der Gesamtzahl.

Der Schätzer der mittleren Überlebenszeit für die D_B ermittelt nach GR-Nr.1 (t_{DB_scaled}) für die Gruppe < Median vs. > Median beträgt 32,4 vs. 33,9 Monate. Auch hier liegt eine Überschneidung der Konfidenzintervalle (siehe Tabelle 35). Der Schätzer der mittleren Überlebenszeit für die D_B ermittelt nach GR-Nr.2 (t_{DB_power}) liegt für die Gruppe < Median vs. > Median bei 31,9 vs. 34,2 Monate. Auch hier überlagern sich die Konfidenzintervalle (siehe Tabelle 36).

t_DB_ scaled (Klassiert)	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	Standard- fehler	95%-Konfidenz- intervall		Schätzer	Standard- fehler	95%-Konfidenz- intervall	
			Unter- grenze	Ober- grenze			Unter- grenze	Ober- grenze
1	32,361	2,221	28,008	36,714	38,000	-	-	-
2	33,854	2,231	29,481	38,227	-	-	-	-
Gesamt	33,116	1,575	30,030	36,203	41,000	-	-	-

Tabelle 35: Auflistung der mittleren und medianen Überlebenszeiten für t_DB_scaled klassiert anhand des Medians in der Pipeline 2 – E-Cadherin. a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

t_DB_ power (Klassiert)	Mittelwert ^a				Median			
	Schätzer	Standard- fehler	95%-Konfidenz- intervall		Schätzer	Standard- fehler	95%-Konfidenz- intervall	
			Unter- grenze	Ober- grenze			Unter- grenze	Ober- grenze
1	31,917	2,230	27,546	36,289	38,000	-	-	-
2	34,218	2,223	29,862	38,574	-	-	-	-
Gesamt	33,116	1,575	30,030	36,203	41,000	-	-	-

Tabelle 36: Auflistung der mittleren und medianen Überlebenszeiten für t_DB_power klassiert anhand des Medians in der Pipeline 2 – E-Cadherin. a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Folgerichtig zeigt sich weder visuell in den dargestellten Überlebenskurven (siehe Abbildung 18) noch im durchgeführten Log-Rank-Test für t_DB_scaled (Chi-Quadrat = 0,278; p = 0,598) oder für t_DB_power (Chi-Quadrat = 0,560; p = 0,454) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Damit wird die Nullhypothese, welche von keinem Zusammenhang zwischen der Höhe des Wertes für D_B und den Überlebenszeiten der Patienten ausgeht, beibehalten.

Überraschenderweise weist in der E-Cadherin basierten Pipeline die Patientengruppe mit den D_B-Werten größer des Medians eine höhere mittlere Überlebenszeit auf. Dies stützt die

Hypothese, dass es sich bei dem Unterschied des Gesamtüberlebens der beiden Gruppen um keinen signifikanten Unterschied handelt.

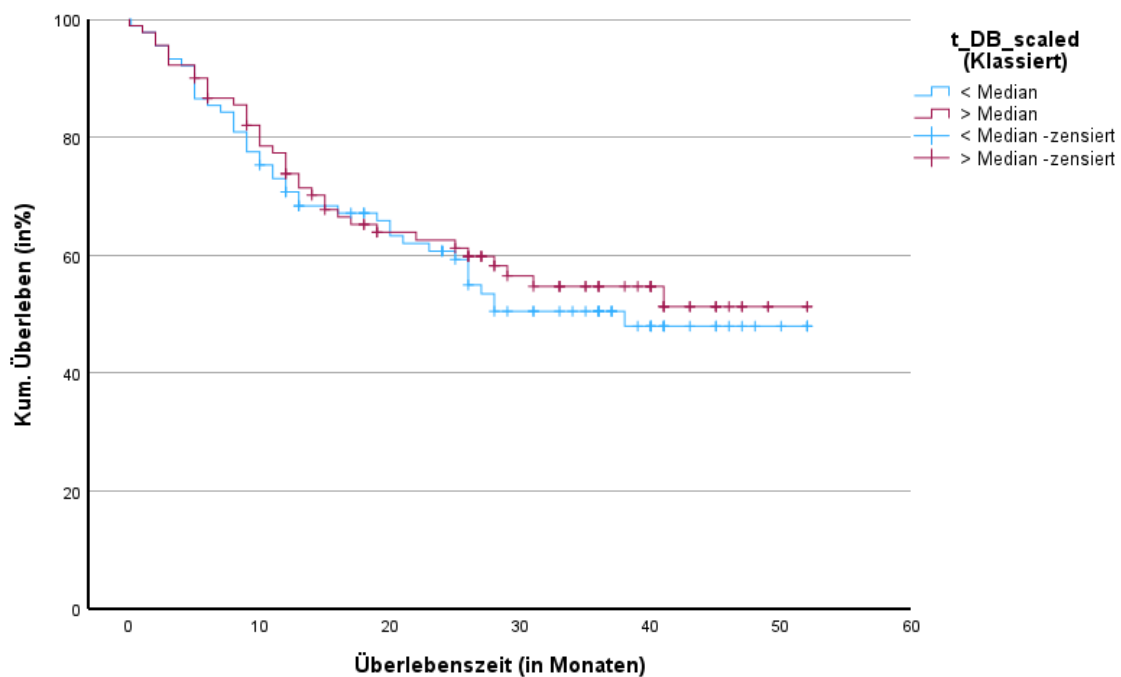
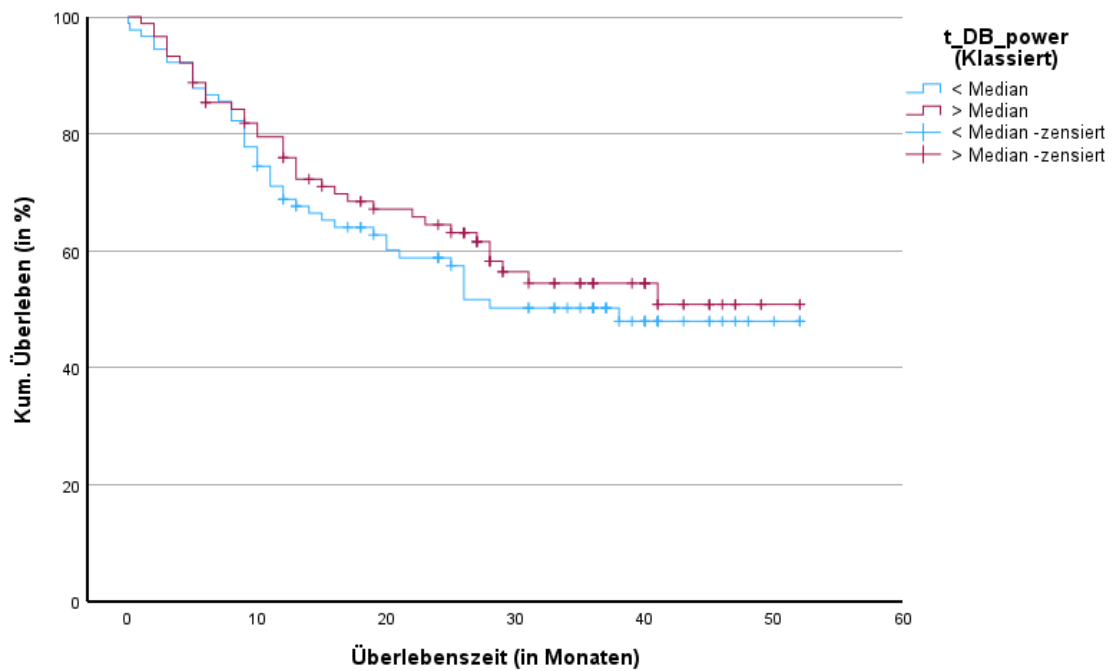


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven zur Überlebenszeit des Kollektivs (N_{E2}) in Abhängigkeit der gemessenen fraktalen Box-Counting-Dimension t_{DB_scaled} (obere Grafik) und t_{DB_power} (untere Grafik) für die Pipeline 2 – E-Cadherin. Auf der Y-Achse ist das kumulative Überleben in Prozent, auf der X-Achse die Gesamtüberlebenszeit in Monaten angegeben. Mittels der blauen Kurve wird die Patientengruppe mit einer D_B kleiner des Medians, mittels der roten Kurve die Patientengruppe mit einer D_B dargestellt. Senkrechte Linien im Graphen zeigen zensierte Daten. Insgesamt zeigt sich ein sehr ähnlicher Verlauf beider Kurven.

5 Diskussion

5.1 Digitale Bildverarbeitung und fraktale Bild-Analyse von Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbungen histologischer Präparate zur Quantifizierung der Tumor-Stroma- bzw. Parenchym-Stroma-Grenze – Stärken und Limitationen

Die mIHC ermöglicht es eine Vielzahl verschiedener Antigene im Sinne von Oberflächenstrukturen, Proteinen und anderen Zellkomponenten im histologischen Präparat parallel darzustellen und stellt daher für die Tumorpathologie und Diagnostik einen erheblichen Mehrwert dar (172, 173). Darüber hinaus hat sie das Potenzial potenzielle prädiktive Marker für ein Therapieansprechen, insbesondere von Immuntherapeutika, vorherzusagen (167, 174, 175). Durch Kombination der mIHC mit softwarebasierter Einzelzell-Detektion und Analyse konnten bspw. beim Adenokarzinom des Ösophagus bereits neue Erkenntnisse hinsichtlich der Zusammensetzung und dem Vorkommen einzelner Subpopulationen von Immunzellen im Tumormikromilieu gewonnen werden (176). Eine Kombination von mIHC, softwarebasierter Einzelzell-Detektion und fraktaler Analyse wurde beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus nach bestem Wissen des Autors dieser Dissertationsschrift bisher nicht durchgeführt. Die in dieser Arbeit entwickelte und verwendete Software-basierte Methodik der digitalen Musterextraktion, Bildverarbeitung und anschließender fraktaler Analyse an digitalisierten Multiplex-Immunfluoreszenz(mIF)-Präparaten versucht diese Lücke zu schließen.

Wie jedes andere komplexe Mess-System, unterliegt aber auch die in dieser Arbeit entwickelte Methodik diversen Limitationen und Störfaktoren, welche sich auf verschiedenen Ebenen manifestieren und das Ergebnis maßgeblich beeinflussen können. Ohne Kenntnis dieser Faktoren ist eine Einordnung der Messergebnisse deutlich beeinträchtigt. Da die empirische Bestimmung der Box-Counting-Dimension D_B komplett auf den dargebotenen Pixeln der digitalen binären Repräsentation der analysierten Struktur basiert, beeinflusst jede Veränderung der Struktur, ob biologischer Genese oder im digitalen Musterextraktions- und bearbeitungsprozess generiert, letztendlich die Pixelmenge und -verteilung und damit den Ergebnisparameter D_B . Im Folgenden sind die verschiedenen Limitationsebenen dargelegt.

5.1.1 Biologische Repräsentativität und histologische Präparation

Ein erster wichtiger Punkt ist die Frage, ob und in welchem Umfang histologische Varianten des klassischen Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus wie das verruköse Karzinom, das basaloide Karzinom und das adenosquamöse Karzinom (17) in den untersuchten Präparaten enthalten sind und in welcher Weise dies zur Beeinflussung der Messergebnisse führt. So handelt es sich bei den Varianten vorwiegend um gut differenzierte Karzinome, welche bei ausreichend großem Vorkommen in der Stichprobe zu Abweichungen führen können. Weiterhin ist bekannt, dass antitumorale Therapien zu histomorphologischen Veränderungen im Tumorgewebe wie Fibrosen, Nekrosen oder azellulären Schleimseen führen können. Dies kann wiederum zu Veränderungen der TNM-Klassifikation führen (31). Da für die verwendeten TMAs weder zu den histologischen Varianten noch Vortherapie klinischen Informationen vorliegen, bleibt deren Auswirkung auf die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch unklar.

Ein bekannter Fakt ist, dass die histologischen Präparate, welche weltweit zur wissenschaftlichen und klinischen Analyse genutzt werden, nicht identisch mit dem Verhältnis der lebenden Zellen im Gewebeverbund in vivo sind. Man muss sie immer als Äquivalentbilder ansehen (177). Insbesondere Artefakte, welche selbst bei sehr sorgfältiger und methodisch hochwertiger Probenentnahme und Präparation nicht immer zu vermeiden sind, tragen hierzu bei. Das wirkt sich auf nachfolgende Verarbeitungsschritte und damit auch auf die fraktale Analyse aus.

Als potenzieller Hauptstörfaktor ist die Effektivität der Extraktion der analysierten Struktur zu nennen. Kann diese nicht optimal abgebildet werden bzw. geht mit der Extraktion der Struktur ein Informationsverlust einher, so wird dies besonders gravierende Auswirkungen auf die erhaltenen Ergebnisparameter haben. Gründe hierfür sind in dieser Arbeit in erster Linie eine unzureichende Intensität der IF-Färbung entweder aufgrund eines inadäquater Färbeverfahrens oder unzureichender Marker-Expression oder zweitens aufgrund keiner ausreichenden Menge an Tumor- bzw. Epithelgewebe. Dies führt aufgrund der damit einhergehenden geringen Pixelzahl im zu analysierenden Bild zu einem deutlich geringeren Wert für D_B .

Um diesem Störfaktor Rechnung zu tragen, erfolgte, wie bereits im Vorfeld beschrieben, eine subjektive Begutachtung und ein Ausschluss aller Präparate, welche eine unzureichende

Intensität der IF-Färbung zeigten oder keine oder nur eine kleine Menge Tumorgewebe bzw. epitheliales Gewebe enthielten. Zudem wurde visuell überprüft, ob die Tumor-Stroma- bzw. Epithel-Stroma-Grenze in allen digitalen Bildern abgebildet wurde.

Zwar bergen alle in diesem Unterkapitel genannten Punkte prinzipiell die Gefahr des Informationsverlustes oder der Informationsverzerrung, jedoch lassen sich diese, wie im Falle der verminderten Antigenexpression oder der Artefakte durch die histopathologische Präparation, durch visuelle Begutachtung und Selektion deutlich reduzieren. Andere potenzielle Störfaktoren wie histologische Subtypen und Vortherapien lassen sich zwar schwer eliminieren, spielen jedoch vermutlich eine untergeordnete Rolle und betreffen auch Ergebnisse von Studien anderer Autoren und schränken daher die Vergleichbarkeit nur begrenzt ein.

5.1.2 Einflussfaktoren auf die empirische Messung der Kästchenzähldimension D_B und Vorgehen zur Kalibrierung der Messmethode

Es sind diverse Faktoren bekannt, welche die Bestimmung der Kästchenzähldimension beeinflussen können (147, 154). Die Höhe der erhobenen fraktalen Messwerte zeigt eine starke Abhängigkeit von den verwendeten Messparametern bei der fraktalen Analyse, jedoch auch von der digitalen pixel-basierten Repräsentation der untersuchten Muster und Strukturen (147). In diesem Unterkapitel erfolgt eine Aufzählung der relevanten Einflussfaktoren sowie Maßnahmen zur Reduktion. Man unterscheidet hierbei Faktoren, welche durch das Muster selbst und dessen digitaler Repräsentation entstehen, von messtechnischen Faktoren.

5.1.2.1 Faktoren des Musters und dessen digitaler Repräsentation:

Die kleinste Einheit eines digitalen Bildes ist der rechteckige Pixel. Diese Tatsache hat für die fraktale Analyse weitreichende Folgen. Erstens ist damit die Auflösung des Bildes limitiert und die reale physikalische Struktur eines Objektes oder Musters aus der Natur kann i.d.R. nicht bis ins letzte Detail abgebildet werden (147). Weiterhin bewirkt dies, dass alle Kurven und Rundungen des Bildes „treppenartig“ dargestellt werden. Gut beobachtbar ist dies, wenn man ein Bild bei maximaler Auflösung betrachtet. Die Folge dessen ist eine Abweichung der empirisch geschätzten von der theoretischen fraktalen Dimension für Bilder, welche viele Rundungen beinhalten (154, 157). Probemessung, welche zur Klärung dieser Abweichungen durchgeführt wurden, zeigten Abweichungen vom theoretischen Wert von 1 und 11 %.

Bemerkt werden muss hierbei, dass es sich um eine nicht-repräsentative Untersuchung bei einfachen euklidischen Figuren mit wenigen Pixeln handelte (147). Für Bilder eines Durchmessers von 100 bis 900 Pixeln scheint eine Abweichung vom theoretischen Wert von 1-5 % normal zu sein (157). In welchem Ausmaß Abweichungen bei sehr großen Bildern mit höher Pixelanzahl vorkommen, ist unklar.

5.1.2.2 Digitale Verarbeitung und Art der digitalen Repräsentation:

Karperien (147) hat einige Untersuchungen zum Gehalt der digitalen Informationen und dem Wert der gemessenen D_B durchgeführt. Die Kernessenz dieser Untersuchungen ist, dass jegliche Art von digitaler Verarbeitung zu einer Veränderung der digitalen Information und damit zu Veränderung der gemessenen D_B führen kann. Eine digitale Verarbeitung ist jedoch in gewissem Maße nicht zu verhindern, um die Bedingungen zur Durchführung einer fraktalen Analyse zu erfüllen (147). Daher sollten nur notwendige Schritte der digitalen Verarbeitung durchgeführt werden. Zudem sollten alle zu untersuchenden Strukturen auf die gleiche Art und Weise digital verarbeitet werden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Auch die Auswahl der Art der Struktur der Bildrepräsentation hat Auswirkungen. Binäre Bilder mit 1-Pixel breiten Umrissen sind die ideale digitale Repräsentation einer Struktur oder eines Musters zur fraktalen Analyse (147). Daneben besteht jedoch auch die Möglichkeit skelettierte Bilder oder Graustufenbilder zu verwenden. Diese können sich je nach zu repräsentierender Struktur besser als digitale Abbildung eignen. Die ausgewählte digitale Repräsentation hat erheblichen Einfluss auf die gemessenen fraktalen Maßzahlen (147). Auch dabei gilt, dass ein Vergleich der fraktalen Maßzahlen nur zwischen Bildern der gleichen Art der Repräsentation erfolgen sollte. Eine Untersuchung von Dixon und Tambasco (178) zeigte jedoch, dass zumindest die Verwendung eines typischen Systems aus optischem Mikroskop und digitaler Kamera zur Darstellung und Digitalisierung von Gewebeproben mit im Durchschnitt 7% Abweichung vom wahren Wert der fraktalen Dimension keinen relevanten Störfaktor der ermittelten Werte der fraktalen Dimension D darstellen.

5.1.2.3 Messtechnische Faktoren:

Startposition des Gitters: Je nach Startposition des Kästchengitters kann eine unterschiedliche Anzahl an Kästchen benötigt werden, um das Bild zu überdecken. Dies führt zu Variationen in dem Wert der gezählten Kästchen N und damit zur berechneten Schätzung der Dimension D_B (155, 157).

Orientierung des zu vermessenden Bildes: Die Orientierung des Bildes, genauer gesagt, das Verhältnis, welcher Teil des Bildes sich oben unten und links oder rechts befindet, kann die berechnete Schätzung von Dimension D_B beeinflussen (154).

Kästchengrößen: Die ausgewählten Kästchengrößen zur Überdeckung des zu vermessenden Bildes haben erhebliche Auswirkungen auf die berechnete D_B . Dabei sind das Kästchengrößenminimum (Min), also die kleinste ausgewählte Kästchengröße, das Kästchengrößenmaximum (Max), also die größte ausgewählte Kästchengröße, als auch der Anstand der ausgewählten Kästchengrößen zueinander, also das Intervall zwischen den Kästchen, relevant (147). Die Auswahl geeigneter Parameter hierfür ist komplex.

Kästchengrößenminimum (Min, in Pixel): Das wählbare Minimum für die Kästchengröße liegt bei einem Pixel. Jedoch sollte das gewählte Kästchengrößenminimum etwas drüber liegen, da bei einer Änderung der Kästchengröße von bspw. einem Pixel auf zwei Pixel keine relevante Änderung der gezählten Kästchen N zu erwarten ist (147). In dieser Arbeit wurde daher ein Min von zwei Pixeln gewählt.

Kästchengrößenmaximum (Max, in %): Laut Karperien (147) sollte das Kästchengrößenmaximum keinesfalls die Länge oder Breite des Bildes überschreiten oder sich ihr annähern, da es sonst zu erheblichen Messfehlern kommt. Gleichzeitig kann ein zu klein gewähltes Kästchengrößenmaximum ebenfalls zu Abweichungen führen. Es werden Größen im Bereich zwischen 20 und 50% der Bildgröße empfohlen. Der genaue Wert ist sehr schwierig zu bestimmen und hängt von den Eigenschaften des Bildes und dem ausgewählten Kästchenintervall ab. In dieser Arbeit wurde daher ein Max von 40% gewählt.

Kästchengrößenintervall: Der am schwierigsten auszuwählende Parameter ist das geeignete Kästchenintervall. Die Auswahl beeinflusst einerseits die Differenz der einzelnen Boxgrößen und damit die Skalierungen, die untersucht werden. Andererseits beeinflusst die Wahl des Kästchengrößenintervalls auch die Menge an Messungen, welche vorgenommen werden, da diese zwischen dem Kästchengrößenmaximum und -minimum liegen. Wählt man das Intervall größer, gibt es weniger Messungen. Wählt man das Intervall kleiner, gibt es mehr Messungen. Leider führt eine „falsche“ Wahl wiederum zur Abweichung der Dimension D_B . Werden übermäßig große Intervalle bei der Kästchengröße gewählt, besteht die Gefahr Änderungen in der Zählungen N zu übersehen. Bei einem zu klein gewählten Kästchenintervall wiederum

kann es in längeren Messphasen zu keiner Änderung von N kommen, was ebenfalls den Wert für D_B verfälscht. Wie stark die Abweichungen ausfallen, hängt jedoch von der Skalierungsregel und den Eigenschaften der zu vermessenden Strukturen ab (147). Einige Autoren liefern grobe Anhaltspunkte zur Auswahl. So geben beispielweise Peitgen et al. (156) an, dass ein Kästchengrößenintervall mit dem Faktor $\frac{1}{2}$ für viele Bilder sinnvoll sein kann. Allerdings sind solche allgemeinen Aussagen nicht einfach übertragbar und bei Bildern mit kleiner Pixelanzahl, wäre dieser Faktor zu groß gewählt und würde zu einer zu geringen Anzahl an Messungen führen. Eine allgemeingültige Aussage könnte jedoch in vielen Fällen zutreffen: Es scheint günstig zu sein, wenn die Menge an Messung innerhalb des Bereiches zwischen Kästchenminimum und Kästchenmaximum größer sind, was wiederum für ein eher kleiner gewähltes Kästchenintervall spricht (147). Letztendlich kann nur versucht werden mittels der bereits genannten Vermessung von Beispielbildern mit bekannter fraktaler Dimension, welche den zu untersuchenden Strukturen sehr ähnlich sind, einen geeigneten Kästchengrößenintervall zu ermitteln. Aufgrund der erschwerten Generierung von passenden Beispielbildern wurden im Rahmen dieser Arbeit daher zwei verschiedene Berechnungsgrundlagen des Gitterrasters parallel verwendet. So kommt es mit GR-Nr. 1 aufgrund des linearen Charakters zu einer größeren Menge an verwendeten Boxgrößen in sehr ähnlichem Abstand und damit zu einem klein gewählten Kästchengrößenintervall. GR-Nr. 2 hingegen nutzt eine exponentielle Funktion zur Berechnung der Boxgrößen und erzeugt daher einerseits ein größeres Boxgrößenintervall und bringt andererseits eine Skalierungsregel in die Berechnung der Boxgrößen ins Spiel.

5.1.2.4 Approximation der fraktalen Dimension mittels einer Regressionsgeraden:

Eine Approximation von D_B erfolgt mittels einer Regressionsgerade, welche anhand der erhobenen Kästchenzählungen N bei verschiedenen Kästchengrößen ε bestimmt wird. Da die Daten selten auf einer geraden Linie liegen, wird eine am besten passende Regressionsgerade ermittelt, welche dann eine Abweichung zum theoretischen Wert verursachen kann. Bei empirischen Messungen kann dies zu relativen Verzerrungen zwischen den Werten der einzelnen Bilder führen (147).

5.1.3 Schwächen und Limitationen der Kästchenzählmethode

Neben der Beeinflussbarkeit durch multiple Faktoren hat die Kästchenzählmethode noch weitere Limitationen. So weist Falconer (153) darauf hin, dass es, insbesondere bei sehr

kleinen Teilmengen wie bspw. einigen abzählbaren Punkten in einem ansonsten leeren Raum, zu Fehlmessungen im Sinne einer zu groß geschätzten Kästchenzähldimension kommen kann. Genau konkretisiert müssten Mengen bestehend aus einem kleinen Punkt oder Mengen aus wenigen unzusammenhängenden Punkten eine Kästchenzähldimension gleich oder annähernd null haben (gleich der topologischen Dimension), jedoch können sie in der empirischen Messung deutlich höhere Werte annehmen. Die konkrete Folge ist, dass für kleine, dichte Mengen bei der experimentellen Dimensionsbestimmung überproportional hohe Werte gemessen werden. Darüber hinaus ist es wichtig zu erwähnen, dass bei der Anwendung der Kästchenzähldimension, insbesondere auf physikalische Objekte, bei immer kleiner werdenden Größenskalen eine Dimensionsabschätzung falsche Werte liefert. Eine sinnvolle Dimensionsbestimmung im molekularen oder supramolekularen Bereich ist damit deutlich erschwert bis unmöglich (153).

Größte Schwäche der fraktalen Analysemethodik ist deren sehr komplexe Kalibrierung aufgrund der geringen bis fehlenden Verfügbarkeit von Beispielbildern. Prinzipiell gilt, dass Beispielmuster generiert werden sollten, welche eine möglichst hohe Ähnlichkeit zu den zu analysierenden Strukturen haben sollten. Anhand dieser sollen die Messvariablen und das Verfahren zur Bestimmung der Boxgrößen mit der kleinsten Differenz des gemessenen Wertes zum wahren Wert der Beispielbilder ermittelt werden (147). Euklidische Formenmuster sind zwar vorhanden, jedoch fehlt ihnen die nötige Komplexität und Pixelanzahl, um vergleichbar mit der digitalen Repräsentation der Tumordinvasionsfront zu sein. Beispielbilder von bekannten Fraktalen, sog „Prefractals“, sind insgesamt rar und ihre theoretische fraktale Dimension durch Berechnung ermittelt und nicht durch empirische Bestimmung. Dadurch weichen diese nicht unerheblich von ihrem bekannten theoretischen Wert ab. Daher wurde entschieden für die Messungen im Rahmen dieser Dissertationsschrift eine Kalibrierung nach allgemeinen Empfehlungen der Literatur vorzunehmen und zwei verschiedene Berechnungsgrundlagen der Gitterraster zu verwenden.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die empirische Vermessung von digitalen Repräsentationen sowohl von theoretischen Fraktalen (Prefractals), als auch von physikalischen Strukturen und natürlichen Objekten je nach Auswahl der Messparameter zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Anwender und Entwickler von fraktaler Analysesoftware wie FracLac, darunter Jelinek et al. (154), konnten jedoch zeigen, dass sich dabei zwar die numerischen Werte der

fraktalen Maßzahlen unterscheiden, jedoch die relative Aussagekraft und die Beziehungen der gemessenen Werte erhalten bleibt.

Zusammenfassend betrachtet sollte man sich bei der Betrachtung und Interpretation der Ergebnisse zwar immer einer gewissen Ungenauigkeit der Messungen bewusst sein, jedoch werden viele der beschriebenen Fehlerquellen eben durch genau jene Unterschiede in Form und Struktur der vermessenen Bilder hervorgerufen, welche auch zur Differenzierung zwischen physiologischem und pathologischem Gewebe führen könnten.

5.2 Die fraktale Box-Counting-Dimension D_B als Parameter zur Differenzierung von Tumor- und Normalgewebe

Der in diesem Studiendesign nachgewiesene Unterschied zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe sowohl für Pan-Zytokeratin und E-Cadherin suggeriert, dass auf Basis beider Marker die Tumor-Stroma-Grenze bzw. Parenchym-Stroma-Grenze adäquat abgebildet werden kann. Betrachtet man beispielhaft die Umrisse der Tumor-Stroma- bzw. Parenchym-Stroma-Grenze in Abbildung 19 lässt sich die korrekte Erfassung auch visuell erfassen.

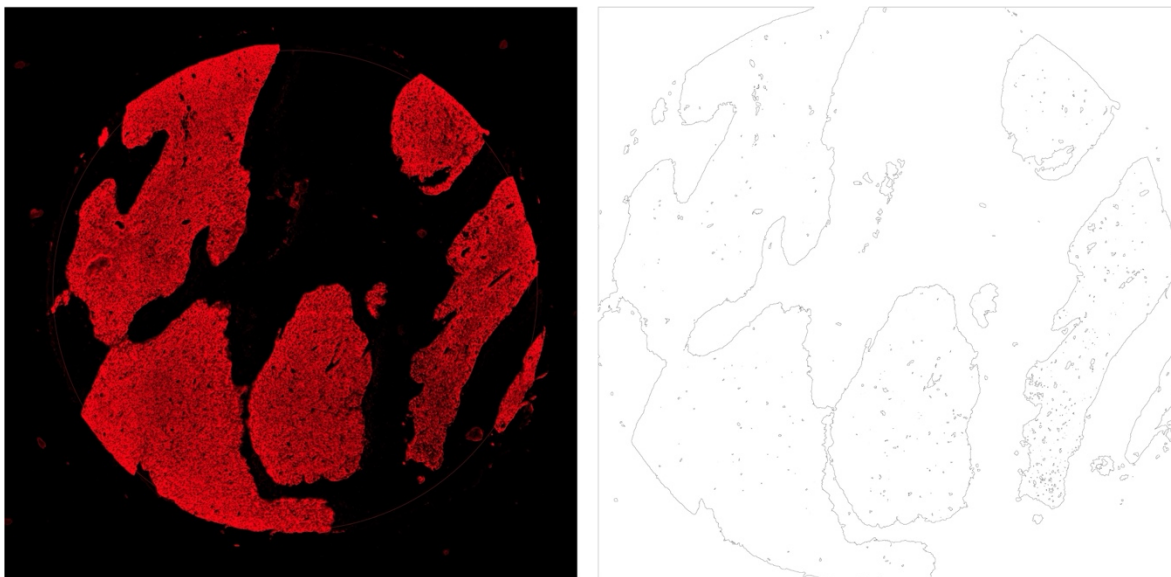


Abbildung 19: Visueller Vergleich der IF-Färbung für Pan-Zytokeratin (links) und der generierte binäre Umriss (rechts).

Bereits in Kapitel 2.3.7 wurde der in vielen Studien beobachtete Zusammenhang beschrieben, dass schlecht differenzierte Karzinome im histologischen Präparat, höhere Werte der fraktalen

Dimension D , aufweisen als gut differenzierte Karzinome oder gesundes Gewebe (27, 28, 30, 160). Vergegenwärtigt man sich nochmals die Definition der FD , welche einen Parameter zur Beschreibung der Komplexität eines Musters darstellt (22, 154), wird klar, dass je komplexer oder raumfüllender eine Struktur beschaffen ist, desto höher der gemessene Wert für D bzw. D_B ausfallen wird. Die histomorphologischen strukturellen Veränderung der Gewebestruktur einer malignen Neoplasie scheinen in den meisten Fällen also komplexere und raumfüllendere Strukturen hervorzubringen als das gesunde Gewebekorrelat. Da die Komplexität jedoch davon abhängt, welche Gewebe- oder Zellstruktur untersucht wird, sind in der Literatur auch Ausnahmen beschrieben. Beispielfhaft kann hierfür die Arbeit von Chan et al. (161) angeführt werden. Untersucht wurden in dieser Studie HE-gefärbte Gewebeschnitte sowohl von gutartigen als auch bösartigen Neubildungen der Brustdrüse. Hier zeigte sich ein umgekehrter Zusammenhang. Ursache dieses inversen Zusammenhangs ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die hohe morphologische Komplexität der dukталen Struktur des Brustdrüsengewebes in Kombination mit Strukturen des Stromas.

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen höhere Mittelwerte für D_B für Tumorgewebe als für Normalgewebe sowohl für unterschiedliche Gitterraster-Methodiken der fraktalen Analyse als auch Marker-unabhängig. Die unterschiedliche Höhe der Werte für t_{DB_scaled} und n_{DB_scaled} im Vergleich mit t_{DB_power} und n_{DB_power} lassen sich hierbei auf die zwei unterschiedlichen Berechnungsgrundlagen der Gitterraster zurückführen. So zeigen sich für GR-Nr. 1 insgesamt höhere Werte als für GR-Nr. 2. Ursache für die niedrigeren Werte von GR-Nr. 2 ist vermutlich die geringere Anzahl an Boxgrößen im höheren Maßstabsbereich. Dies führt zu einer geringeren Menge an gemessenen Einzel-Werten für D_B und damit zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Dimension D_B , sodass die Werte, welche mit GR-Nr. 1 ermittelt wurden, vermutlich näher am wahren Wert von D_B liegen.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass die Komplexität der Morphologie der Tumorinvasionsfront oder Tumor-Stroma-Grenze des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus die Komplexität der Morphologie der Epithel-Stroma-Grenze des Normalgewebes übersteigt und dieser Komplexitäts-Unterschied zur Differenzierung zwischen Tumor- und Normalgewebe genutzt werden kann.

5.3 Die fraktale Box-Counting-Dimension D_B als Parameter zur Differenzierung der histologischen Grading-Klassen

Die Ergebnisse zur Unterscheidung der histologischen Grading-Klassen zeichnen ein kontroverses Bild. Prinzipiell zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Grading-Klassen, beschränkt sich jedoch auf den signifikanten Unterschied der Grading-Klasse G2 und G3 in der Pan-Zytokeratin-Pipeline für beide Gittertaster-Methodiken und den signifikanten Unterschied von Grading-Klasse G1 und G2 in der E-Cadherin-Pipeline ausschließlich für den Parameter t_{DB_scaled} . Bei allen Signifikanzen handelt es sich um einen schwachen Effekt nach Cohen.

Einige Autoren konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der fraktalen Dimension D und dem histopathologischen Grading feststellen. So zeigten Tambasco und Magliocco eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Höhe des Wertes für D und zellulärer Entdifferenzierung an HE-gefärbten TMAs beim duktalem Mammakarzinom. Auf dieser Basis gelang eine Differenzierung anhand der Dimension D in die 3 Grading-Klassen (179). Die Studie von Fabrizii et al. konnte signifikante Unterschiede mittels multifraktaler Analysen zwischen den verschiedenen Kategorien der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) erfassen (180).

Betrachtet man die einzelnen Unterschiede der Messungen dieser Arbeit jeweils isoliert, so könnte ein Grund für die signifikante Unterscheidung ein Expressionsverlust der Tumorzellen von Pan-Zytokeratin und E-Cadherin mit zunehmender Entdifferenzierung sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit würden suggerieren, dass der Expressionsverlust von E-Cadherin bereits früher im Laufe der Entdifferenzierung eintritt als der Expressionsverlust von Zytokeratinen. Während der Verlust der E-Cadherin-Expression beim Plattenepithelkarzinom explizit beschrieben und sogar mit einem reduzierten klinischen Outcome vergesellschaftet ist (181, 182), lässt sich ein Expressionsverlust im Falle der Zytokeratine in der klinischen Praxis zwar vereinzelt beobachten (1 Fall im Rahmen dieser Studie), jedoch in diversen Studien (36, 183) nicht belegen. In der überwiegenden Anzahl der Fälle kam es zu keiner relevanten Reduktion der IF-Intensität von Pan-Zytokeratin beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus im Vergleich zum Normalgewebe. In Anbetracht des konstanten Pan-Zytokeratin-Färbeverhaltens und der Gesamtbetrachtung der gesamten Daten, welche weder in der Pan-Zytokeratin- noch in der E-Cadherin-Pipeline signifikante Unterschiede zwischen den

Gradingklassen G1 und G3 festgestellt werden konnten, erscheint die Interpretation der isolierten Gradingklassenunterschiede als Ursache eines Expressionsverlustes der Bio-Marker als unwahrscheinlich.

Eine andere plausible Interpretation der Ergebnisse ist, dass die Komplexität der Tumorinvasionsfront im Verlauf der Entdifferenzierung nicht linear zunimmt, sondern schwankt. In den dargestellten Boxplots der Grading-Klassen (siehe Abbildung 13 bis 16) zeigt sich, mit Ausnahme von t_{DB_power} in der E-Cadherin-Pipeline, ein geringerer Wert des Medians von D_B der Klasse G2 im Vergleich zu G1 und G3. Warum sich dieser Zusammenhang nicht für t_{DB_power} in der E-Cadherin-Pipeline zeigt und welche funktionellen und strukturellen Prozesse des Tumorgewebes für diese Schwankung ursächlich sind, bleibt unklar.

Weiterhin müssen auch die Einschränkungen der untersuchten Studienkohorte miteinbezogen werden. Bei einer nicht unerheblichen Anzahl der untersuchten Präparate konnte keine eindeutige Zuordnung zu einer Grading-Klasse durch den beurteilenden Pathologen vorgenommen werden, sodass eine Umkodierung der Daten durchgeführt und Präparate der höheren angegebenen Grading-Klasse zugeordnet wurden. Weiterhin ist die Stichprobengröße sehr heterogen und die Grading-Klasse G2 im Vergleich zu G1 und G3 deutlich überrepräsentiert. Beides könnte zu einem nicht unerheblichen Bias geführt haben. Zusammengefasst bleiben die Ursachen für die isolierten signifikanten Unterschiede der einzelnen Grading-Klassen unklar. Ob D_B auf Basis der Tumor-Invasionsfront beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus als Differenzierungsparameter des histopathologischen Grading dienen kann oder ob fälschlicherweise die Nullhypothese abgelehnt wurde, sollte in weiteren Untersuchungen eruiert werden. Möglicherweise sind die Ergebnisse anderer Autoren, welche eine eindeutigere Differenzierung der einzelnen Grading-Klassen bei anderen Tumorentitäten aufzeigen konnten, auf die Analyse anderer Strukturen als die Tumorinvasionsfront zurückzuführen.

5.4 Die fraktale Box-Counting-Dimension D_B als prognostischer Faktor des Gesamtüberlebens

Die prognostische Relevanz der fraktalen Dimension D in der wissenschaftlichen Literatur ist ambivalent. Studien bzgl. des oralen Plattenepithelkarzinoms (27), Larynxkarzinoms (184)

oder Mammakarzinoms (179) zeigen einen signifikanten Unterschied des Gesamtüberlebens der Patienten für histologische Präparate mit hoher und niedriger fraktaler Dimension D , wobei ein hoher Wert für D i. d. R. mit einem schlechteren Outcome einhergeht. Auf der anderen Seite konnten Untersuchungen an histologischen Präparaten des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) von Lee et al. (185) weder beim Adeno- noch beim Plattenepithelkarzinom einen signifikanten Unterschied der Überlebenszeiten in Abhängigkeit einer hohen oder niedrigen fraktalen Dimension eruieren.

Die Messwerte für D_B im Studiendesign dieser Arbeit konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit hohen und der Gruppe mit niedrigen Werten von D_B nachweisen. Dies gilt sowohl für beide Gitterraster-Methodiken als auch für beide Marker.

Aufgrund des untersuchten Patientenkollektivs muss das Ergebnis der Überlebensanalyse jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Erstens ist das Gesamtüberleben in der untersuchten Kohorte mit 55,3% (siehe Tabelle 29 und 30 sowie 33 und 34 im Ergebnissteil) relativ hoch. Dies ist auch der Tatsache geschuldet, dass es zu stark divergierenden Nachbeobachtungszeiten in der untersuchten Kohorte kam, sodass eine sehr große Menge an zensierten Fällen vorhanden ist. Dies wird einen beträchtlichen Einfluss auf das Ergebnis haben. Da weniger als 50% der Patienten in der Gruppe D_B kleiner dem Median bis zum Ende der Nachbeobachtungszeit verstorben waren, konnte auch kein Vergleich der medianen Überlebenszeit erfolgen. Weiterhin befanden sich in der untersuchten Kohorte keine Patienten mit nachgewiesener Fernmetastasierung bzw. keine weitere Nachbeobachtung der Patienten bezüglich eines Auftretens. Gerade diese Patientenkohorte wäre hinsichtlich einer prognostischen Relevanz von D_B jedoch interessant gewesen, da eine Tumorinvasion als Beginn des Metastasierungsprozesses anzusehen ist.

Abschließend muss festgehalten werden, dass in diesem Studiendesign keine prognostische Relevanz von D_B auf Basis der Morphologie der Tumorinvasionsfront hinsichtlich des Gesamtüberlebens beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der starken Limitationen in der untersuchten Kohorte, sollten die Messungen jedoch an einem anderen Patientenkollektiv wiederholt werden.

5.5 Weiterentwicklung

Diese Arbeit beschränkte sich auf die Bestimmung der Kästchenzähldimension D_B mittels monofraktaler Analysen. Wesentlich komplexere und weiterführende fraktale Vermessungsmethoden, wie der Parameter der Lakunarität, ein Maß, welches beschreibt, wie groß die Lücken in einer Menge oder in einem Muster sind (149), oder Multifraktalität (157) wurden nicht verwendet. Daher besteht ein Aspekt der Weiterentwicklung in der Ausweitung der Analysen mittels der genannten Methoden. Bei Multifraktalen handelt es sich um eine Gruppe von Fraktalen, welche im Gegensatz zu anderen Fraktalen (man kann sie auch als Monofraktale bezeichnen) innerhalb ihrer Gesamtstruktur auf lokaler Ebene mehrere Skalierungsregeln aufweisen (157, 186). Das bedeutet, dass die Selbstähnlichkeit und die Art des Details in bestimmtem Maße innerhalb eines Bildes variieren (147). Legt man die Annahme zugrunde, dass die verwendeten monofraktalen Analysen aufgrund der Komplexität von Tumorwachstum und Gewebestruktur viel zu undifferenzierte oder grobe Werte liefern, so könnte die Verwendung von multifraktalen Analysemethoden wesentlich differenzierte Werte liefern.

Neben weiteren fraktalen Parametern stehen zahllose weitere Bio-Marker als potenzielle Differenzierungs- und Prognosefaktoren zur Verfügung, welche durch die Methode der mIHC zur Visualisierung von zellulären Strukturen genutzt werden können. Im Falle des Plattenepithelkarzinom des Ösophagus wurden bereits dutzende Marker wie spezifische Zytokeratine 4 und 14 oder COX-2 (Cyclooxygenase-2), deren Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe verändert ist, identifiziert (183, 187).

Unabhängig von der Verwendung erweiterter Methoden der fraktalen Geometrie und Verwendung anderer Biomarker beschreibt die fraktale Dimension D nur einen Teilaspekt der Form eines Objektes, sodass sie immer in ein Gesamtsystem aus multiplen Variablen einbezogen werden sollte, um komplexe Fragestellungen zu beantworten (20).

6 Zusammenfassung

Die Fähigkeit zur Invasion ist der erste Schritt zur Metastasierung und Teil des malignen Phänotyps einer Krebszelle. Dabei handelt es sich um einen vielschichtigen Migrationsprozess von Tumorzellen in engem Zusammenspiel mit Tumormikromilieu und extrazellulärer Matrix. Morphologisches Korrelat ist die dabei die Tumordinvasionsfront oder Tumor-Stroma-Grenze. Trotz deren nachgewiesener prognostischer Relevanz im histopathologischen Grading des Plattenepithelkarzinom des Ösophagus war aufgrund schwerer Objektivierbarkeit und hoher Interobservervariabilität eine Etablierung dieses Parameters bisher nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine auf open-source Software basierende Methodik zur digitalen Musterextraktion, Bildverarbeitung und fraktalen Analyse relevanter pathologischer Strukturen aus digitalisierten Multiplex-Immunfluoreszenz(mIF)-Präparaten von Tumor- und Normalgewebe entwickelt und zur Quantifizierung der Tumor-Stroma-Grenze bzw. Epithel-Stroma-Grenze an 291 tissue micro arrays (TMAs) von insgesamt 179 Patienten verwendet. Dazu wurde eine mIF-Färbung etabliert, um relevante Marker der Invasivität von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus abzubilden (Epithelial-neoplastisches Kompartiment, Pan-Zytokeratin; Zellkohäsivität, E-Cadherin; Hypoxie, Carboanhydrase IX; Zellkerne, DAPI). Nach Digitalisierung mithilfe eines Slide-Scanners und Definition einer Region of Interest (ROI) im Programm QuPath wurde die ROI mittels ImageJ in 3 farbkodierte Kanäle aufgeteilt und die Bilddateien in Cellprofiler exportiert. In Cellprofiler werden, mithilfe zweier selbst-konstruierter Pipelines, die Nuklei und Zellmembranen auf Basis der Marker DAPI und Pan-Zytokeratin sowie E-Cadherin detektiert und Stromazellen von Tumorzellen bzw. Epithelzellen separiert. Auf Grundlage dieser Einzelzell-basierten Detektion kann im Programm ImageJ die Tumor-Stroma- bzw. Parenchym-Stroma-Grenze erfasst und in das ImageJ-Plugin FracLac exportiert werden. Das Plugin FracLac misst die fraktale Dimension des importierten Bildes und liefert einen numerischen Wert als Ergebnisparameter.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand dabei die Frage, ob die fraktale Dimension D , bzw. ihr empirisch gemessenes Korrelat die Box-Counting-Dimension D_B , als Diskriminierungsfaktor zur Unterscheidung von Tumorgewebe und Normalgewebe sowie der Grading-Klassen des aktuellen histopathologischen Grading geeignet ist. Weiterhin sollte dessen Relevanz hinsichtlich seiner prognostischen Bedeutung für das Gesamtüberleben untersucht werden.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass eine Quantifizierung der Morphologie der Tumorinvasionsfront des Plattenepithelkarzinoms und der Epithel-Stroma-Grenze des Normalgewebes des Ösophagus mittels der fraktalen Box-Counting-Dimension D_B auf Basis der Bio-Marker DAPI, Pan-Zytokeratin und E-Cadherin im mIF-gefärbten histologischen Präparat möglich ist. Zudem konnte dargelegt werden, dass sich D_B als Diskriminierungsfaktor zur Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe eignet. Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass eine fraktale Analyse, welche unterschiedliche Gitterrasterparameter für gleiche Messungen verwendet, zwar Unterschiede der absoluten gemessenen Werte für D_B ermittelt, jedoch relevante Zusammenhänge und Schlussfolgerungen über verschiedene Gitterrasterparameter hinweg aufgezeigt werden können. Zwar gelang in diesem Studiendesign mittels D_B keine Unterscheidung über alle Grading-Klassen hinweg und es zeigte sich auch keine prognostische Relevanz der D_B hinsichtlich des Gesamtüberlebens, jedoch könnten uneinheitliche Stichprobengrößen und Nachbeobachtungszeiträume der Patienten sowie ein hoher Anteil zensierter Daten der untersuchten Patientenkohorte hierfür mitverantwortlich sein. Weitere Untersuchungen mit anderen Studienkohorten, zusätzliche Untersuchung weiterer Bio-Marker sowie die Etablierung einer weiterführenden multifraktalen Analyse sind nötig, um die Relevanz und mögliche klinische Anwendung der fraktale Dimension D_B als Diskriminierungsfaktor zu überprüfen.

7 Literaturverzeichnis

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144.
2. Wagener C, Müller O. *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression und Therapie von Krebs*: Thieme; 2020.
3. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews cancer*. 2006;6(5):392-401.
4. Donhuijsen K. Histologisches Malignitätsgrading: Prinzipien, Möglichkeiten und klinische Relevanz. *Dt Ärzteblatt*. 1998;95(39):2391-5.
5. Abdo J, Wichman CS, Dietz NE, Ciborowski P, Fleegel J, Mittal SK, et al. Discovery of Novel and Clinically Relevant Markers in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Esophageal Cancer Specimen. *Frontiers in Oncology*. 2018;8.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
7. Domper Arnal MJ, Ferrández Arenas A, Lanás Arbeloa. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J Gastroenterol*. 2015;21:7933–43.
8. Napier KJ, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World J Gastrointest Oncol*. 2014;6(5):112-20.
9. Arnold M, Ferlay J, van Berge Henegouwen MI, Soerjomataram I. Global burden of oesophageal and gastric cancer by histology and subsite in 2018. *GUT*. 2020;69.
10. Sun J-M, Shen L, Shah MA, Enzinger P, Adenis A, Doi T, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for first-line treatment of advanced oesophageal cancer (KEYNOTE-590): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet*. 2021;398(10302):759-71.
11. Doki Y, Ajani JA, Kato K, Xu J, Wyrwicz L, Motoyama S, et al. Nivolumab Combination Therapy in Advanced Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(5):449-62.

12. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus, Langversion 4.02023.
13. Then EO, Lopez M, Saleem S, Gayam V, Sunkara T, Culliford A, et al. Esophageal Cancer: An Updated Surveillance Epidemiology and End Results Database Analysis. *World J Oncol.* 2020;11(2):55-64.
14. Adenis A, Penel N, Horn S, Dominguez S, Vanhuyse M, Mirabel X. Palliative Chemotherapy Does Not Improve Survival in Metastatic Esophageal Cancer. *Oncology.* 2010;79(1-2):46-54.
15. Wittekind C. TNM: Klassifikation maligner Tumoren, Ausgabe 8. UICC, editor: Wiley VCH; 2017.
16. Sarbia M, Bittinger F, Porschen R, Dutkowski P, Willers P, Gabbert HE. Prognostic Value of Histopathologic Parameters of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer.* 1995;76.
17. Bläker H. Grading der Tumoren des tubulären Verdauungssystems: Ösophagus, Magen, Kolon und Rektum. *Pathologe.* 2016;37.
18. Sarbia M. Plattenepithelkarzinome und andere Tumoren des Ösophagus. In: Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W, editors. *Pathologie Verdauungstrakt und Peritoneum.* 3. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
19. Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N. WHO classification of tumors of the digestive system. Lyon2010.
20. Cross SS. Fractals in Pathology. *Journal of Pathology.* 1997;182:1-8.
21. Cross SS, Cotton DWK. The Fractal Dimension may be a useful morphometric Discriminant in Histopathology. *Journal of Pathology.* 1992;166:409-11.
22. Mandelbrot BB. *Die fraktale Geometrie der Natur.* Basel: Birkhäuser Verlag; 1987.
23. Lennon FE, Cianci GC, Cipriani NA, Hensing TA, Zhang HJ, Chen C-T, et al. Lung cancer - a fractal viewpoint. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2015;12:664-75.
24. Di Ieva A, Grizzi F, Sherif C, Matula C, Tschabitscher M. Angioarchitectural heterogeneity in human glioblastoma multiforme: A fractal-based histopathological assessment. *Microvascular Research.* 2011;81(2):222-30.
25. Waliszewski P, Wagenlehner F, Gattenlöhner S, Weidner W. On the Relationship Between Tumor Structure and Complexity of the Spatial Distribution of Cancer Cell

- Nuclei: A Fractal Geometrical Model of Prostate Carcinoma. *The Prostate*. 2015;75:399-414.
26. Ahammer H, Helige C, Dohr G, Weiss-Fuchs U, Juch H. Fractal dimension of the choriocarcinoma cell invasion front. *Physica D: Nonlinear Phenomena*. 2008;237(4):446-53.
27. Goutzanis L, Papadogeorgakis N, Pavlopoulos PM, Katti K, Petsinis V, Plochoras I, et al. Nuclear fractal dimension as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2008;44(4):345-53.
28. Tambasco M, Eliasziw M, Magliocco A. Morphologic complexity of epithelial architecture for predicting invasive breast cancer survival. *Journal of Translational Medicine*. 2010;8.
29. Rajković N, Li X, Plataniotis KN, Kanjer K, Radulovic M, Milošević NT. The Pan-Cytokeratin Staining Intensity and Fractal Computational Analysis of Breast Tumor Malignant Growth Patterns Prognosticate the Occurrence of Distant Metastasis. *Frontiers in Oncology*. 2018;8.
30. Streba L, Forțofoiu MC, Popa C, Ciobanu D, Gruia CL, Mogoantă SŞ, et al. A pilot study on the role of fractal analysis in the microscopic evaluation of colorectal cancers. *Rom J Morphol Embryol*. 2015;56(1):191-6.
31. Wittekind C. Pathologie und Klassifikation des Ösophaguskarzinoms. *Onkologe*. 2014;20.
32. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*. 2010;70(14):5649-69.
33. Society JE. Japanese Classification of Esophageal Cancer, 11th Edition: part I. Esophagus. 2017;14:1-36.
34. Brown IS, King-yin Lam A, Saito T, Kawachi H, Fujii S. Tumours of the oesophagus. 2019 31.03.2024. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board Digestive system tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency of Research on Cancer. 5.
35. Turzynski A. Pathologie Lübeck: Turzynski, A., Gemeinschaftspraxis Pathologie Lübeck; 2001 [Available from: <https://www.pathologen-luebeck.de/klassifikationen-2/#ui-id-5>].
36. Menz A, Gorbokon N, Viehweger F, Lennartz M, Hube-Magg C, Hornsteiner L, et al. Pan-keratin Immunostaining in Human Tumors: A Tissue Microarray Study of 15,940 Tumors. *International Journal of Surgical Pathology*. 2023;31(6):927-38.

37. Takahashi H, Shikata N, Senzaki H, Shintaku M, Tsubura A. Immunohistochemical staining patterns of keratins in normal oesophageal epithelium and carcinoma of the oesophagus. *Histopathology*. 1995;26(1):45-50.
38. Bollschweiler E, Baldus SE, Schröder W, Schneider PM, Hölscher AH. Staging of esophageal carcinoma: length of tumor and number of involved regional lymph nodes. Are these independent prognostic factors? *J Surg Oncol*. 2006;94(5):355-63.
39. Tachibana M, Dhar DK, Kinugasa S, Kotoh T, Shibakita M, Ohno S, et al. Esophageal cancer with distant lymph node metastasis: prognostic significance of metastatic lymph node ratio. *Journal of clinical gastroenterology*. 2000;31(4):318-22.
40. Edwards JM, Hillier VF, Lawson RAM, Moussalli H, Hasleton PS. Squamous carcinoma of the oesophagus: histological criteria and their prognostic significance. *Br J Cancer*. 1989;59.
41. Brücher BLD, Stein HJ, Werner M, Siewert JR. Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor in patients with a primary resected tumor with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2001;92(8):2228-33.
42. Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y, Watanabe H, Nakanishi Y, Kondo H, et al. No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*. 1999;72(2):94-8.
43. Shiozaki H, Doki Y, Yamana H, Isono K. A multi-institutional study of immunohistochemical investigation for the roles of cyclin D1 and E-cadherin in superficial squamous cell carcinoma of the esophagus*. *Journal of Surgical Oncology*. 2002;79(3):166-73.
44. Ren P, Yu ZT, Xiu L, Wang M, Liu HM. Elevated serum levels of human relaxin-2 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013;19(15):2412-8.
45. Rai V, Abdo J, Agrawal DK. Biomarkers for Early Detection, Prognosis, and Therapeutics of Esophageal Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24.
46. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(5):362-74.
47. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(7):445-57.

48. Ono M, Sakamoto M, Ino Y, Moriya Y, Sugihara K, Muto T, et al. Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. *Cancer*. 1996;78(6):1179-86.
49. Rubin MA, Putzi M, Mucci N, Smith DC, Wojno K, Korenchuk S, et al. Rapid ("Warm") Autopsy Study for Procurement of Metastatic Prostate Cancer¹. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(3):1038-45.
50. Brawn PN, Speights VO. The dedifferentiation of metastatic prostate carcinoma. *British Journal of Cancer*. 1989;59(1):85-8.
51. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics*. 2003;33(1):49-54.
52. Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz C-D. Tumor dedifferentiation: An important step in tumor invasion. *Clinical & Experimental Metastasis*. 1985;3(4):257-79.
53. Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*. 1982;217(4564):998-1003.
54. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1994;1198.
55. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology*. 2009;188(1):11-9.
56. Davidson LA, Keller RE. Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development*. 1999;126(20):4547-56.
57. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(6):442-54.
58. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis. *Cancer Research*. 2006;66(17):8319-26.
59. Burdsal CA, Damsky CH, Pedersen RA. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development*. 1993;118(3):829-44.

60. Savagner P, Kusewitt DF, Carver EA, Magnino F, Choi C, Gridley T, et al. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 2005;202(3):858-66.
61. Perl A-K, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998;392(6672):190-3.
62. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-Mesenchymal Transition: A Cancer Researcher's Conceptual Friend and Foe. *The American Journal of Pathology*. 2009;174(5):1588-93.
63. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial—mesenchymal and mesenchymal—epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of Cellular Physiology*. 2007;213(2):374-83.
64. Lang SH, Hyde C, Reid IN, Hitchcock IS, Hart CA, Gordon Bryden AA, et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *The Prostate*. 2002;52(4):253-63.
65. LaGamba D, Nawshad A, Hay ED. Microarray analysis of gene expression during epithelial—mesenchymal transformation. *Developmental Dynamics*. 2005;234(1):132-42.
66. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(4):265-73.
67. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.
68. Massagué J. TGF- β in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30.
69. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes & development*. 1996;10(19):2462-77.
70. Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JWF, Zimmerman RME, Oosting J, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer*. 2006;94(5):661-71.

71. Cannito S, Novo E, Compagnone A, Valfrè di Bonzo L, Busletta C, Zamara E, et al. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial–mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(12):2267-78.
72. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature*. 2005;436(7047):123-7.
73. Czyż J. The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis. *Cellular & molecular biology letters*. 2008;13:92-102.
74. Hsu M-Y, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *Journal of Cell Science*. 2000;113(9):1535-42.
75. Nabeshime K, Inoue T, Shimao Y, Kataoka H, Kono M. Invited Reviews-Cohort migration of carcinoma cells: Differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histology and histopathology*. 1999;14(4):1183-98.
76. Nabeshima K, Moriyama T, Asada Y, Komada N, Inoue T, Kataoka H, et al. Ultrastructural study of TPA-induced cell motility: human well-differentiated rectal adenocarcinoma cells move as coherent sheets via localized modulation of cell-cell adhesion. *Clinical & Experimental Metastasis*. 1995;13(6):499-508.
77. Friedl P, Noble PB, Walton PA, Laird DW, Chauvin PJ, Tabah RJ, et al. Migration of Coordinated Cell Clusters in Mesenchymal and Epithelial Cancer Explants in Vitro¹. *Cancer Research*. 1995;55(20):4557-60.
78. Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker E-B, Friedl P. Collective Cell Movement in Primary Melanoma Explants: Plasticity of Cell-Cell Interaction, β 1-Integrin Function, and Migration Strategies^{1,2}. *Cancer Research*. 2002;62(7):2125-30.
79. Alexander S, Koehl GE, Hirschberg M, Geissler EK, Friedl P. Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008;130(6):1147-54.
80. Keren K, Pincus Z, Allen GM, Barnhart EL, Marriott G, Mogilner A, et al. Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature*. 2008;453(7194):475-80.
81. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell*. 1996;84(3):359-69.
82. Wolf K, Friedl P. Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2009;26(4):289-98.

83. Adams JC. Cell-matrix contact structures. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2001;58(3):371-92.
84. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995;7(5):619-27.
85. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(2):118-32.
86. Berx G, van Roy F. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009.
87. Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *Journal of Cell Biology*. 1989;108(6):2435-47.
88. Zheng ZH, Sun XJ, Zhou HT, Shang C, Ji H, Sun KL. Analysis of metastasis suppressing function of E-cadherin in gastric cancer cells by RNAi. *World J Gastroenterol*. 2005;11(13):2000-3.
89. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Research*. 2008;68(10):3645-54.
90. Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*. 2008;359(26):2814-23.
91. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *Journal of Cell Biology*. 1991;113(1):173-85.
92. Kartenbeck J, Haselmann U, Gassler N. Synthesis of junctional proteins in metastasizing colon cancer cells. *European Journal of Cell Biology*. 2005;84(2):417-30.
93. Parker C, Rampaul RS, Pinder SE, Bell JA, Wencyk PM, Blamey RW, et al. E-cadherin as a prognostic indicator in primary breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2001;85(12):1958-63.
94. Mendonsa AM, Na T-Y, Gumbiner BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*. 2018;37(35):4769-80.
95. Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of Their E-Cadherin Expression. *Journal of Cell Biology*. 1999;147(3):631-44.

96. Schreiber SC, Giehl K, Kastilan C, Hasel C, Mühlenhoff M, Adler G, et al. Polysialylated NCAM Represses E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion in Pancreatic Tumor Cells. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1555-66.
97. Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol*. 1996;148(5):1345-50.
98. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
99. Friedl P, Maaser K, Klein CE, Niggemann B, Krohne G, Zänker KS. Migration of Highly Aggressive MV3 Melanoma Cells in 3-Dimensional Collagen Lattices Results in Local Matrix Reorganization and Shedding of $\alpha 2$ and $\beta 1$ Integrins and CD441. *Cancer Research*. 1997;57(10):2061-70.
100. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 2002;110(6):673-87.
101. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor Cell Interactions with the Extracellular Matrix During Invasion and Metastasis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1993;9(Volume 9, 1993):541-73.
102. Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*. 1997;385(6616):537-40.
103. Wolf K, Friedl P. Functional imaging of pericellular proteolysis in cancer cell invasion. *Biochimie*. 2005;87(3):315-20.
104. Werb Z. ECM and Cell Surface Proteolysis: Regulating Cellular Ecology. *Cell*. 1997;91(4):439-42.
105. Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*. 2007;9(8):893-904.
106. Van der Stappen JWJD, Hendriks T, Wobbes T. Correlation between collagenolytic activity and grade of histological differentiation in colorectal tumors. *International Journal of Cancer*. 1990;45(6):1071-8.
107. Urbanski SJ, Edwards DR, Maitland A, Leco KJ, Watson A, Kossakowska AE. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *British Journal of Cancer*. 1992;66(6):1188-94.

108. Friedl P, Wolf K. Tube Travel: The Role of Proteases in Individual and Collective Cancer Cell Invasion. *Cancer Research*. 2008;68(18):7247-9.
109. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell*. 2010;18(6):884-901.
110. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature*. 2001;411(6835):375-9.
111. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiological Reviews*. 1996;76(1):69-125.
112. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo T-K, et al. Vascular Stroma Formation in Carcinoma in Situ, Invasive Carcinoma, and Metastatic Carcinoma of the Breast. *Clinical Cancer Research*. 1999;5(5):1041-56.
113. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
114. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, et al. Evidence of Fibroblast Heterogeneity and the Role of Fibroblast Subpopulations in Fibrosis. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1994;72(3):283-92.
115. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, Nash GB, Rainger GE, Salmon M, et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol*. 2005;26(3):150-6.
116. Chang HY, Chi J-T, Dudoit S, Bondre C, Van De Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(20):12877-82.
117. Durning P, Schor SL. Fibroblasts from patients with breast cancer show abnormal migratory behaviour in vitro. *The Lancet*. 1984;324(8408):890-2.
118. Ryan GB, Cliff WJ, Gabbiani G, Irle C, Montandon D, Statkov PR, et al. Myofibroblasts in human granulation tissue. *Human pathology*. 1974;5(1):55-67.
119. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48.
120. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nature cell biology*. 2007;9(12):1392-400.

121. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell*. 2006;124(2):263-6.
122. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(3):161-74.
123. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, et al. A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors. *Cancer Research*. 2004;64(19):7022-9.
124. O'Sullivan C, Lewis CE, McGee JOD, Harris AL. Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. *The Lancet*. 1993;342(8864):148-9.
125. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of Macrophage Infiltration with Angiogenesis and Prognosis in Invasive Breast Carcinoma. *Cancer Research*. 1996;56(20):4625-9.
126. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of Pathology*. 2002;196(3):254-65.
127. Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JCM, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2008;15(4):1069-74.
128. Chen JJW, Lin Y-C, Yao P-L, Yuan A, Chen H-Y, Shun C-T, et al. Tumor-Associated Macrophages: The Double-Edged Sword in Cancer Progression. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(5):953-64.
129. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(18):10356-61.
130. Mäkitie AA, Almangush A, Rodrigo JP, Ferlito A, Leivo I. Hallmarks of cancer: Tumor budding as a sign of invasion and metastasis in head and neck cancer. *Head Neck*. 2019;41(10):3712-8.
131. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology*. 2017;30(9):1299-311.

132. Alessandrini L, Zanoletti E, Cazzador D, Sbaraglia M, Franz L, Tealdo G, et al. Tumor budding to investigate local invasion, metastasis and prognosis in temporal bone squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2022;229:153719.
133. Yao G, Fang Y, Fu Y, Xu J, Song H, Zhu H, et al. Tumor budding as an indicator for lymph node metastasis and prognosis of early gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023;149(9):5603-16.
134. Li Z, Liu L, Wang B, Ying J, He J, Xue L. Tumor budding and tumor-infiltrating lymphocytes can predict prognosis in pT1b esophageal squamous cell carcinoma. *Thoracic Cancer.* 2023;14(25):2608-17.
135. Lorenzo Soriano L, Ordaz Jurado G, Pontones Moreno JL, Villarroya Castillo S, Hernández Girón S, Sáez Moreno I, et al. Tumor Budding: Prognostic Value in Muscle-invasive Bladder Cancer. *Urology.* 2019;130:93-8.
136. Kim KB, Ahn JH, Kwon SW, Lee SJ, Lee Y, Park SY, et al. Tumor budding as a predictor of disease-free survival in patients with cholangiocarcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2023;29:1611216.
137. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med.* 2001;193(6):727-40.
138. Fernandez E, Jelinek HF. Use of fractal theory in neuroscience: methods, advantages, and potential problems. *Methods.* 2001(24):309-21.
139. Crissman JD, Liu WY, Gluckman JL, Cummings G. Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer.* 1984;54(12):2995-3001.
140. Horn LC, Fischer U, Raptis G, Bilek K, Hentschel B, Richter CE, et al. Pattern of invasion is of prognostic value in surgically treated cervical cancer patients. *Gynecologic Oncology.* 2006;103(3):906-11.
141. Einkenkel J, Braumann U-D, Horn L-C, Pannicke N, Kuska J-P, Schütz A, et al. Evaluation of the invasion front pattern of squamous cell cervical carcinoma by measuring classical and discrete compactness. *Computerized Medical Imaging and Graphics.* 2007;31(6):428-35.
142. Cao C, Chen Y, Masood R, Sinha UK, Kobiela A. α -Catulin marks the invasion front of squamous cell carcinoma and is important for tumor cell metastasis. *Mol Cancer Res.* 2012;10(7):892-903.

143. Cortegoso AVB, Laureano NK, Silva ADd, Danilevicz CK, Magnusson AS, Visioli F, et al. Cell proliferation markers at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: comparative analysis in relation to clinicopathological parameters of patients. *Journal of Applied Oral Science*. 2017;25.
144. da Cunha IW, Souza MJL, da Costa WH, Amâncio AM, Fonseca FP, Zequi SdC, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype at invasion front of squamous cell carcinoma of the penis influences oncological outcomes. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2016;34(10):433.e19-.e26.
145. Aw Yong KM, Li Z, Merajver SD, Fu J. Tracking the tumor invasion front using long-term fluidic tumoroid culture. *Scientific Reports*. 2017;7(1):10784.
146. Bueno-de-Mesquita JM, Nuyten DS, Wesseling J, van Tinteren H, Linn SC, van de Vijver MJ. The impact of inter-observer variation in pathological assessment of node-negative breast cancer on clinical risk assessment and patient selection for adjuvant systemic treatment. *Annals of Oncology*. 2010;21:40-7.
147. Karperien A. Defining Microglial Morphology: Form, Function, and Fractal Dimension. In: University CS, editor. 2004.
148. Barnsley MF. *Fraktale: Theorie und Praxis der deterministischen Geometrie*. Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1995.
149. Peitgen H-O, Saupe D, Barnsley MF, Devaney RL, Mandelbrot BB, Voss RF. *The Science of Fractal Images*. New York: Springer-Verlag; 1988.
150. Jelinek HF, Jones CL, Warfel MD, Lucas C, Depardieu C, Aurel G. Understanding Fractal Analysis? The Case of Fractal Linguistics. *Complexus*. 2006;3(1-3):66-73.
151. Deiser O. Einführung in die Mengenlehre: Die Mengenlehre Georg Cantors und ihre Axiomatisierung durch Ernst Zermelo 2022b. Available from: <https://www.aleph1.info/Resource?method=get&obj=Pdf&name=mengenlehre1.pdf>.
152. Deiser O. Grundbegriffe der Mathematik: Sprache, Zahlen und erste Erkundungen: Deiser, Oliver; 2022a. Available from: <https://www.aleph1.info/?call=Puc&permalink=grundbegriffe>.
153. Falconer KJ. *Fraktale Geometrie: Mathematische Grundlagen und Anwendungen*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1993.
154. Jelinek HF, Fernandez E. Neurons and fractals: how reliable and useful are calculations of fractal dimensions? *Journal of Neuroscience Methods*. 1998(81):9-18.
155. Feder J. *Fractals*. New York: Plenum Press; 1988.

156. Peitgen H-O, Jürgens H, Saupe D. Bausteine des Chaos - Fraktale: Klett-Cotta/Springer-Verlag; 1992.
157. Karperien A. FracLac for ImageJ: Karperien, A.; 1999-2013 [Available from: <https://imagej.net/ij/plugins/fracLac/fracLac.html>].
158. Nonnenmacher TF, Losa GA, Weibel ER. Fractals in biology and medicine: Birkhäuser; 1993.
159. Claridge E, Hall PN, Keefe M, Allen JP. Shape analysis for classification of malignant melanoma. *Journal of Biomedical Engineering*. 1992;14(3):229-34.
160. Landini G, Rippin JW. How important is Tumour Shape? Quantification of the epithelial-connective Tissue Interface in oral Lesions using local connected Fractal Dimension Analysis. *Journal of Pathology*. 1996;179:210-7.
161. Chan A, Tuszynski JA. Automatic prediction of tumour malignancy in breast cancer with fractal dimension. *RSocopen sci*. 2016;3.
162. Hosseini ZS, Hashemi Gholpayeghani SMR, Sotoudeh M, Malekzadeh R. A fractal based approach to evaluate the progression of esophageal squamous cell dysplasia. *Biomedical Signal Processing and Control*. 2019;48:273-89.
163. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. 2017;7(1):16878.
164. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671-5.
165. Institute B. Cellprofiler: Broad Institute; [Available from: <https://cellprofiler.org/>].
166. McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kametsky L, Cimini BA, Karhohs KW, et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLOS Biology*. 2018;16(7):e2005970.
167. Mayer A, Haist M, Loquai C, Grabbe S, Rapp M, Roth W, et al. Role of Hypoxia and the Adenosine System in Immune Evasion and Prognosis of Patients with Brain Metastases of Melanoma: A Multiplex Whole Slide Immunofluorescence Study. *Cancers*. 2020;12(12):3753.
168. Tóth ZE, Mezey É. Simultaneous Visualization of Multiple Antigens with Tyramide Signal Amplification using Antibodies from the same Species. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2007;55(6):545-54.

169. Beasley NJP, Wykoff CC, Watson PH, Leek R, Turley H, Gatter K, et al. Carbonic Anhydrase IX, an Endogenous Hypoxia Marker, Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and its Relationship to Hypoxia, Necrosis, and Microvessel Density. *Cancer Research*. 2001;61(13):5262-7.
170. Davis AS, Richter A, Becker S, Moyer JE, Sandouk A, Skinner J, et al. Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2014;62(6):405-23.
171. Cohen J. (1992). A power primer. *Psychological Bulletin*, 155–159. A power primer. *Psychological Bulletin*. 1992;112:155–9.
172. Harms PW, Frankel TL, Moutafi M, Rao A, Rimm DL, Taube JM, et al. Multiplex Immunohistochemistry and Immunofluorescence: A Practical Update for Pathologists. *Modern Pathology*. 2023;36(7):100197.
173. Wharton KA, Wood D, Manesse M, Maclean KH, Leiss F, Zuraw A. Tissue Multiplex Analyte Detection in Anatomic Pathology – Pathways to Clinical Implementation. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8.
174. Parra ER, Uraoka N, Jiang M, Cook P, Gibbons D, Forget M-A, et al. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Scientific reports*. 2017;7(1):13380.
175. Gorris MAJ, Halilovic A, Rabold K, van Duffelen A, Wickramasinghe IN, Verweij D, et al. Eight-Color Multiplex Immunohistochemistry for Simultaneous Detection of Multiple Immune Checkpoint Molecules within the Tumor Microenvironment. *The Journal of Immunology*. 2018;200(1):347-54.
176. Sundaram S, Kim EN, Jones GM, Sivagnanam S, Tripathi M, Miremedi A, et al. Deciphering the Immune Complexity in Esophageal Adenocarcinoma and Pre-Cancerous Lesions With Sequential Multiplex Immunohistochemistry and Sparse Subspace Clustering Approach. *Frontiers in Immunology*. 2022;13.
177. Lüllmann-Rauch R, Asan E. *Taschenbuch Histologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2015.
178. Dixon V, Tambasco M. Effects of image resolution and noise on estimating the fractal dimension of tissue specimens. *Anal Quant Cytol Histol*. 2010;32(5):269-79.

179. Tambasco M, Magliocco AM. Relationship between tumor grade and computed architectural complexity in breast cancer specimens. *Human Pathology*. 2008;39(5):740-6.
180. Fabrizii M, Moinfar F, Jelinek HF, Karperien A, Ahammer H. Fractal analysis of cervical intraepithelial neoplasia. *PLoS One*. 2014;9(10):e108457.
181. Tamura S, Shiozaki H, Miyata M, Kadowaki T, Inoue M, Matsui S, et al. Decreased E-cadherin expression is associated with haematogenous recurrence and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *BJS (British Journal of Surgery)*. 1996;83(11):1608-14.
182. Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, Ishigami S, et al. Slug Expression in the E-cadherin Preserved Tumors Is Related to Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(3):1174-80.
183. Chung J-Y, Braunschweig T, Hu N, Roth M, Traicoff JL, Wang Q-H, et al. A Multiplex Tissue Immunoblotting Assay for Proteomic Profiling: A Pilot Study of the Normal to Tumor Transition of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2006;15(7):1403-8.
184. Delides A, Panayiotides I, Alegakis A, Kyroudi A, Banis C, Pavlaki A, et al. Fractal dimension as a prognostic factor for laryngeal carcinoma. *Anticancer Research*. 2005;25(3B):2141-4.
185. Lee HL, Tambasco M, Otsuka S, Wright A, Klimowicz A, Petrillo S, et al. Digital differentiation of non-small cell carcinomas of the lung by the fractal dimension of their epithelial architecture. *Micron* 2014;67:125-31.
186. Smith TGJ, Lange GD, Marks WB. Fractal methods and results in cellular morphology - dimensions, lacunarity and multifractals. *Journal of Neuroscience Methods*. 1996;69:123-36.
187. Su H, Hu N, Shih J, Hu Y, Wang Q-H, Chuang EY, et al. Gene Expression Analysis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Reveals Consistent Molecular Profiles Related to a Family History of Upper Gastrointestinal Cancer. *Cancer Research*. 2003;63(14):3872-6.

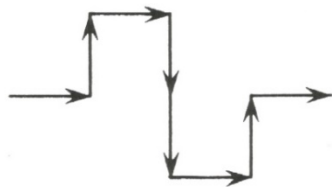
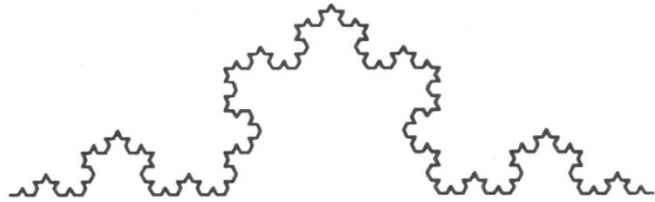
8 Anhang

→
replaced by



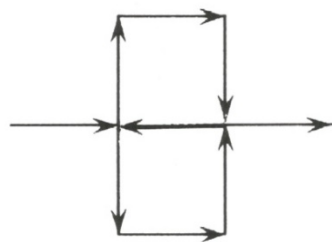
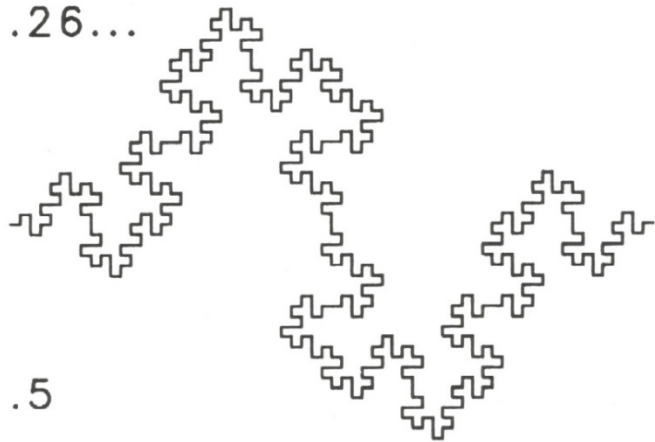
$$N=4, r=1/3,$$

$$D=\log(4)/\log(3)=1.26\dots$$



$$N=8, r=1/4,$$

$$D=\log(8)/\log(4)=1.5$$



$$N=9, r=1/3,$$

$$D=\log(9)/\log(3)=2$$

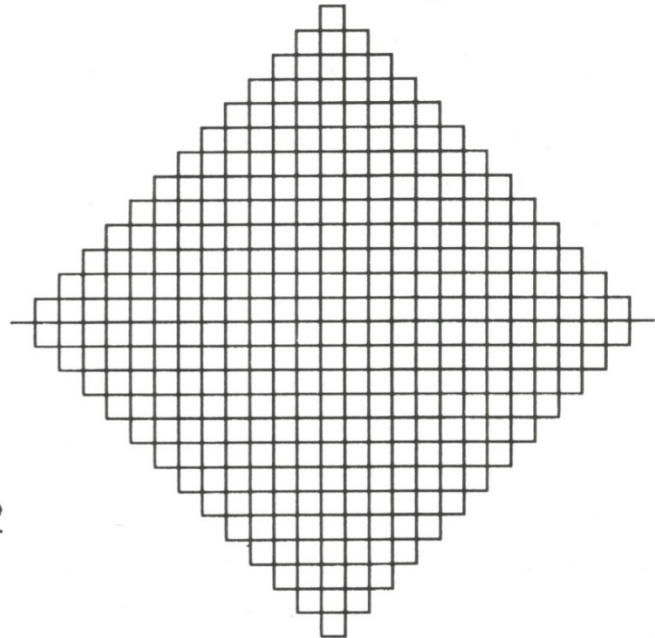


Abbildung 20: Variationen der rekursiven Konstruktion der Koch-Kurve und deren Ähnlichkeitsdimension.
Quelle: unverändert übernommen aus (149).

Klassifikation	Tumor
T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Hochgradige Dysplasie (maligne Zellen begrenzt durch die Basalmembran)
T1	Tumor infiltriert die Lamina propria oder Muscularis mucosae oder Submucosa
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis mucosae
T1b	Tumor infiltriert Submucosa
T2	Tumor eingewachsen infiltriert die Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Adventitia
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie Aorta, Wirbelkörper oder Trachea
T4a	Tumor infiltriert die Pleura, das Perikard, die Vena azygos, das Zwerchfell oder das Peritoneum
T4b	Tumor eingewachsen (infiltriert die Aorta), einen Wirbelkörper oder die Trachea
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-2 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 3-6 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in mehr als 7 regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen nachgewiesen
M1	Fernmetastasen nachgewiesen

Tabelle 37: Klinische TNM-Klassifikation des Ösophaguskarzinoms. Quelle: modifiziert nach (15).

Stadium	T	N	M
I	T1	N0, N1	M0
II	T2	N0, N1	M0
	T3	N0	
III	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IVa	T4a, T4b	jedes N	M0
	jedes T	N3	M0
IVb	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 38: Plattenepithelkarzinom des Ösophagus - Klinische Stadieneinteilung nach UICC 2018. Quelle: modifiziert nach (15).

Prognostische Gruppe	T	N	M	Grad	Lokalisation
O	Tis	N0	M0	N/A	Jede
IA	T1a	N0	M0	1, X	Jede
IB	T1a	N0	M0	2, 3	Jede
	T1b	N0	M0	Jeder	Jede
	T2	N0	M0	1, X	Jede
	T3	N0	M0	1, X	Intrathorakal, unten
IIA	T2	N0	M0	2, 3	Jede
	T2	N0	M0	X	Jede
	T3	N0	M0	Jeder	Intrathorakal, unten
	T3	N0	M0	1	Intrathorakal, Mitte, oben

IIB	T3	N0	M0	2, 3	Intrathorakal, Mitte, oben
	T3	N0	M0	Jeder	X
	T3	N0	M0	X	Jede
	T1	N1	M0	Jeder	Jede
IIIA	T1	N2	M0	Jeder	Jede
	T2	N1	M0	Jeder	Jede
IIIB	T2	N2	M0	Jeder	Jede
	T3	N1, N2	M0	Jeder	Jede
	T4a	N0, N1	M0	Jeder	Jede
IVA	T4a	N2	M0	Jeder	Jede
	T4b	Jedes	M0	Jeder	Jede
IVB	Jedes	Jedes	M1	Jeder	Jede

Tabelle 39: Prognostische Gruppeneinteilung nach UICC 2018 – Plattenepithelkarzinome des Ösophagus.
Quelle: modifiziert nach (15).

Häufigkeit	Geschlecht		Grading-Klassen kodiert			Überlebensstatus	
	F	M	1	2	3	deceased	survival
total	43	136	55	103	21	80	99
prozentual	24 %	76 %	30,7 %	57,5 %	11,7 %	44,7 %	55,3 %

Tabelle 40: Häufigkeitsverteilung der klinischen Parameter "Geschlecht", "Grading-Klassen" und "Überlebensstatus" der 179 eingeschlossenen Patienten (N_{E2}).

	Alter	Überlebenszeit (in Monaten)
Mittelwert	64,13	23,74
Standardfehler des Mittelwerts	0,759	1,111
Median	64	24
Minimum	5	0
Maximum	85	52

Tabelle 41: Lagemaße der klinischen Parameter „Alter“ und „Überlebenszeit“.

9 Danksagung

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater, [REDACTED], für die Möglichkeit danken an diesem interessanten sowie theoretisch und praktisch anspruchsvollen Thema zu forschen und zu promovieren. Insbesondere danke ich ihm für die freundliche, gute und konsistente Betreuung und die zahlreichen hilfreichen Ratschläge und Anmerkungen zu meiner Arbeit, sowie für die zügige Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes. Seine exzellente wissenschaftliche Expertise und langjährige Erfahrung haben dieses Projekt und mein zukünftiges Arbeiten wesentlich geprägt. Mein Dank gebührt zudem dem Leiter des Instituts, [REDACTED], für die Ermöglichung und Förderung meiner Promotion und [REDACTED] für ihre hervorragende Arbeit bei der IF-Färbung der histologischen Präparate.

Weiterhin möchte ich meinem ehemaligen Mitbewohner und guten Freund [REDACTED] für den engen Austausch sowohl von Problemen als auch Erfolgen unserer Promotionsvorhaben danken. Er war für mich stets ein Vorbild und Motivator.

Abschließend möchte ich meiner Frau [REDACTED] und meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung, Geduld und Mühe danken. Sie haben mir in schwierigen Phasen den Rücken freigehalten und mir geholfen mich immer wieder neu zu motivieren. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

10 Eidesstattliche Erklärung

Wissenschaftlicher Vorstand der Universitätsmedizin
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Obere Zahlbacher Straße 63
55131 Mainz

Ich, Kevin Ralph Winger, erstelle hiermit folgende schriftliche Erklärung: Ich habe die Dissertationsschrift mit dem Titel "Quantifizierung der Morphologie der Tumorinvasionsfront des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus mittels der fraktalen Box-Counting-Dimension D_B " eigenständig verfasst. Alle von mir genutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstigen Hilfsmittel und jegliche Form von Unterstützung sind ordnungsgemäß angegeben. Passagen, die wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Werken übernommen wurden, sind eindeutig gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben versehen. Es erfolgte keine kommerzielle Vermittlung der Möglichkeit zur Durchführung des Promotionsvorhabens. Insbesondere habe ich keine Person oder Organisation beauftragt, die gegen Entgelt Betreuer für die Erstellung von Dissertationen sucht. Mir ist die "Satzung der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" in ihrer jeweils geltenden Fassung bekannt, und ich habe ihre Grundsätze in meiner wissenschaftlichen Arbeit beachtet. Sofern zutreffend, bestätige ich, dass ich die Vorgaben der Ethik-Kommission gemäß Tierschutzgesetz und gemäß Gentechnikgesetz in ihrer jeweils geltenden Fassung zur Kenntnis genommen habe und deren Grundsätze in meiner wissenschaftlichen Arbeit eingehalten wurden. Meine Dissertationsschrift mit dem Titel „Quantifizierung der Morphologie der Tumorinvasionsfront des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus mittels der fraktalen Box-Counting-Dimension D_B " wurde bisher keiner anderen Fachrichtung oder Fakultät vorgelegt. Ich besitze bisher keinen anderen Doktorgrad. Ein bisher erworbener Doktorgrad wurde mir nicht aberkannt. Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet. Ich versichere, dass die oben genannten Punkte wahrheitsgemäß und vollständig sind.

Mit freundlichen Grüßen,

Kevin Ralph Winger

11 Tabellarischer Lebenslauf

██████████, den 25.02.2026

Kevin Ralph Winger