

Jutta Lungstras

Dr. med.

Vergleich zwischen Immunhistochemie und RT-PCR zum Nachweis disseminierter Tumorzellen beim kolorektalen Karzinom

Geboren am 12.08.1977 in Konstanz

Staatsexamen am 25.04.2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Peter Kienle

Trotz radikaler chirurgischer Tumorentfernung mit R0 Situation und ohne Hinweis auf Metastasen in der konventionellen Diagnostik entwickeln ca. 50 % der Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb von 5 Jahren Rezidive.

Es stellt sich also die Frage nach neuen diagnostischen Möglichkeiten zur Früherkennung der Rezidive, um eine bessere Prognoseeinschätzung und damit möglicherweise auch eine bessere Therapie zu erreichen. In diesem Zusammenhang wird seit einigen Jahren der Nachweis disseminierter Tumorzellen untersucht.

Ziel dieser Studie war es zum einen, disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit kolorektalem Karzinom immunhistochemisch nachzuweisen. Über Kaplan-Meier Überlebenskurven sollte die prognostische Aussage für die Patienten, bei denen über Immunhistochemie disseminierte Tumorzellen gefunden wurden, untersucht werden. Außerdem sollen die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit bereits vorliegenden Knochenmarks-RT-PCR-Daten derselben Patientengruppe verglichen werden, um damit die beiden am häufigsten verwendeten Nachweisverfahren disseminierter Tumorzellen in Bezug auf ihre Methodik und prognostische Aussage einander gegenüber zu stellen.

Die Studie wurde als retrospektive Studie durchgeführt. Die Patientenproben (Knochenmarksaspirate) wurden an der chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg in einem Zeitraum von 1996-1998 nach Aufklärung und Einverständnis der Patienten gewonnen. Als Positivkontrolle für die immunhistochemischen Färbungen diente die Tumorzelllinie HT-29 (kolorektales Karzinom). Für die Negativkontrolle wurden Lymphozyten aus peripherem Blut von gesunden Spendern nach Aufklärung und Einverständnis gewonnen. Die Daten zur Knochenmarks-RT-PCR lagen bereits vor und stammen vom selben Patientenkollektiv wie die Knochenmarksaspirate für die immunhistochemischen Färbungen.

Für die Immunhistochemie kam die 2-Schritt-Indirekte Methode zur Anwendung. Als Primärantikörper wurden CK-20 und Pan-CK verwendet. CK-20 und Pan-CK Antikörper färben das Zytoskelett epithelialer Zellen und sind damit Marker für Tumoren epithelialer Herkunft wie u. a. die Adenokarzinome des Kolons und Rektums. Die Auswertung der Färbungen erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher anhand der von Borgen et al entwickelten objektiven Kriterien zur Evaluation immunhistochemisch gefärbter Zellen.

Für die Erstellung der Kaplan-Meier Überlebenskurven lagen klinische Follow-up Daten vor. Es wurden Daten zur Metastasierung, Rezidivausbildung und dem postoperativen Überleben der Patienten erfasst.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine gute Färbequalität und Spezifität: Nur drei Patienten mit Tumorzellen in den CK-20 und Pan-CK Färbungen mussten aufgrund von positiven Isotypenkontrollen als negativ gewertet werden. Aufgrund von Kreuzreaktivität mit verwandten Epitopen, die auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden und irregulär exprimierter epithelialer Antigene durch hämatopoetische Zellen kann es zu falsch positiven Färbungen kommen. Trotz der von Borgen et al beschriebenen Kriterien zur Evaluation gefärbter Zellen ist die eindeutige Identifizierung von gefärbten Zellen nicht immer möglich und auch eine Objektivität nicht vollständig gegeben: bei den Bewertungen der gefärbten Zellen kam es zu deutlichen Diskrepanzen zwischen Untersucher 1 und 2. Insgesamt identifizierte Untersucher 2 mehr Tumorzellen als Untersucher 1.

Der Vergleich von Immunhistochemie und RT-PCR zeigte für die RT-PCR eine höhere Tumorzelldetektionsrate. Diese könnte durch eine höhere Sensitivität des RT-PCR-Verfahrens erklärt werden. Die Spezifität wird jedoch wie bei der Immunhistochemie durch Kreuzreaktivitäten eingeschränkt. Die Kontrolle der Ergebnisse über eine Überprüfung der Morphologie, wie nach immunhistochemischer Färbung möglich, entfällt bei der RT-PCR.

Weder in den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung, noch in denen der RT-PCR zeigte sich anhand der Kaplan-Meier Überlebenskurven ein signifikant besseres Überleben für Patienten ohne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark.

Unsere Studie ist die bisher größte vorliegende Studie, die den immunhistochemischen und RT-PCR-Nachweis von disseminierten Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom hinsichtlich der prognostischen Relevanz verglichen hat. Die Tumorzell-detektionsraten lagen im Vergleich mit der Literatur im unteren Streubereich. Sowohl der immunhistochemische als auch der RT-PCR Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark war nicht mit der onkologischen Prognose der Patienten korreliert.

Um die Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in Bezug auf ihre prognostische Aussage in der Zukunft besser zu definieren, sind weitere große Studien mit standardisierten Protokollen für die technische Durchführung sowohl der Immunhistochemie als auch für die RT-PCR zwingend notwendig.