

Elena Vanessa Jürgens, geb.Ehlen

Dr. med.

## **Methodenvergleich zur Aufarbeitung von Knochenmarksproben im Rahmen der Tumorzellsuche bei Mammakarzinom-Patientinnen**

Geboren am 06.05.1976 in Mainz

Reifeprüfung am 19.06.1995 in Mainz

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995/96 bis WS 2001/02

Physikum am 09.09.1997 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 17.04.2002 an der Universität in Heidelberg

Promotionsfach: Frauenheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Bastert

Das Mammakarzinom stellt die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau dar. Trotz frühzeitiger Diagnose und Therapie kommt es oftmals zur Ausbildung von Fernmetastasen mit letalem Ausgang. Ziel der heutigen Tumorforschung ist es, die Risikogruppe für die Ausbildung von Fernmetastasen mit neuen Methoden genauer zu definieren, um eine exakt auf das Erkrankungsstadium ausgerichtete Therapieplanung zu ermöglichen und somit die Letalität zu senken. Das besondere Augenmerk wird hierbei auf die Tumorzell dissemination gerichtet, die einer manifesten Metastasierung häufig viele Jahre vorausgeht, sich der konventionellen Diagnostik jedoch bislang entzieht.

Als Untersuchungsmaterial ist das Knochenmark besonders geeignet, da das Mammakarzinom früh und häufig in das Skelett metastasiert, das Knochenmark leicht und risikoarm zu gewinnen und als mesenchymales Organ frei von epithelialen Strukturen ist. Eine Auftrennung von hämatopoetischen Zellen und verstreuten Tumorzellen ist im Knochenmark durch eine immunzytologische Differenzierung mit monoklonalen Antikörpern

möglich. Dies erfordert zuvor allerdings eine Bearbeitung des nativen Knochenmarks zur Entfernung der Erythrozyten. Hierzu stehen mehrere Verfahren zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein etabliertes Verfahren, eine Kombination aus Dichtegradientenzentrifugation und Ammoniumchloridlyse (Ficoll-Methode), mit einer neueren reinen Ammoniumchloridlyse (Quicklysis) hinsichtlich ihrer Eignung zur immunzytologischen Tumorzellsuche verglichen werden.

Beim Mammakarzinom werden zur Differenzierung von Knochenmarks- und Tumorzellen monoklonale Antikörper gegen Zytokeratine als Bestandteil der epithelialen Zellwand und Muzine verwendet. Muzin-Antikörper wie BM2, der durch das Onkologische Labor der Universitätsfrauenklinik Heidelberg entwickelt worden war, sind im Laufe der Zeit zunehmend in den Verdacht geraten, viele falsch-positive Knochenmarksbefunde durch unspezifische Anfärbung hämatopoetischer Zellen verursacht zu haben. Deshalb sollte gleichzeitig untersucht werden, in welcher Häufigkeit es zu unspezifischen Reaktionen von Knochenmarkszellen mit BM2 kommt.

Die Arbeit gliederte sich somit in zwei Teile: Zum einen wurde an 25 Knochenmarksproben in einer durchflusszytometrischen Messreihe untersucht, welchen Einfluss die beiden zu vergleichenden Aufbereitungsmethoden auf die Zellzusammensetzung des Knochenmarks nehmen. Aus messtechnischen Gründen wurde ein drittes Lyse-Verfahren, die Q-Prep-Lyse, die auf einer Ameisensäure-Lyse mit anschließender Fixierung durch Formaldehyd basiert, hinzugenommen. Zusätzlich wurde in diesem Teil der Arbeit die unspezifische Anfärbung von Knochenmarkszellen durch BM2 untersucht.

Der zweite Teil bestand aus einer immunzytologischen Messreihe an 160 Knochenmarksproben, bei der diese mit beiden zu vergleichenden Methoden aufgearbeitet und daraus anschließend Zytoprin-Präparate hergestellt wurden. Es erfolgte die Färbung nach dem APAAP-Prinzip und eine anschließende automatisierte Untersuchung auf positive Knochenmarksbefunde.

Im ersten Teil der Arbeit zeigte sich, dass es durch die kombinierte Dichtegradientenzentrifugation mit Ammoniumchloridlyse zu statistisch signifikanten Zellanreicherungen fast aller untersuchten Zellreihen ( $p=0,000-0,007$ ) mit Ausnahme der Monozyten ( $p=0,051$ ) kam. Im Vergleich zur Kontrollmethode (Q-Prep.Lyse) kam es jedoch auch durch die neue Quicklysis zu erheblichen Zellverlusten.

Hinsichtlich der BM2-Positivitäten ließen sich in 2,413% der Gesamtknochenmarkszellen unspezifische Anfärbungen von Knochenmarkszellen nachweisen, wovon ein großer Teil (25-39% je nach Methode) aus Stammzellen bestand.

Die immunzytologische Färbung mit cytokeratinspezifischen Antikörpern und nachfolgender automatisierter Bildauswertung ergab, dass beide Verfahren die gleichen 11 von 134 Fälle als Tumor-positiv hervorbrachten (Kappa-Koeffizient 1) und somit kein qualitativer Unterschied hinsichtlich der Detektion von Tumorzellen bestand.

Es hat sich im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass das neue Lyse-Verfahren, die Quicklysis, hinsichtlich der Routine-Immunzytologie in gleichem Maße geeignet ist wie die Dichtegradientenzentrifugation. Bezüglich der Knochenmarkszusammensetzung war sie dem älteren Verfahren sogar überlegen, da es zu weniger Zellabreicherungen kam. Bedenkt man zusätzlich, dass der Arbeits- und Materialaufwand bei der Quicklysis im Vergleich zur Ficoll-Methode bedeutend geringer ist, zeigt sich ein zusätzlicher Vorteil des neuen Verfahrens. Es hat sich allerdings im Vergleich zur Q-Prep-Lyse als Kontrollverfahren auch gezeigt, dass selbst die besser geeignete Quicklysis immer noch zu deutlichen Zellverlusten führt. Daraus läßt sich für die Zukunft die Forderung nach weniger aggressiven Aufreinigungsverfahren für Knochenmarksproben formulieren.

Zudem konnten die in der Literatur beschriebenen unspezifischen Anfärbungen durch Antikörper, die gegen Muzine gerichtet sind, nachvollzogen und differenziert werden. Es zeigten sich falsch-positive Anfärbungen von bis zu 2,413% der Knochenmarkszellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte daher insgesamt gezeigt werden, dass das Quicklysis-Verfahren zur Aufarbeitung von Knochenmark besser geeignet ist als das herkömmliche Dichtegradientenzentrifugationsverfahren. Zudem unterstreichen die erhobenen Daten, dass eine immunzytologische Untersuchung mit Muzin-Antikörpern wegen unspezifischer falsch-positiver Ergebnisse nicht mehr zur Anwendung kommen sollte.