

Zusammenfassung

Sophia Katharina Maria Ackermann
Dr. med.

In-situ Immunofluoreszenzbildgebung von vitalem humanen Pankreasgewebe mittels faseroptischer Mikroskopie

Fach/Einrichtung: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Eduard Ryschich

Das duktale Pankreaskarzinom ist eine der am häufigsten tödlich verlaufenden Krebserkrankungen. Bis heute ist die Operation die einzige kurative Therapie, doch meist wird die Erkrankung erst in weit fortgeschrittenem und damit inoperablem Stadium diagnostiziert. Kann eine Operation in kurativer Absicht stattfinden, ist deren Ergebnis häufig eine R1-Situation, welche ein Rezidiv begünstigen kann.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines faseroptischen Mikroskop-Systems für die in-situ Identifizierung von fluoreszenzmarkierten Strukturen wie Tumorzellen und -abgrenzungen sowie mikroskopischen Blutgefäßen im vitalen Pankreasgewebe. Dazu wurde nach einem geeigneten Fluoreszenzmarker gesucht, die Tauglichkeit des faseroptischen Fluoreszenzmikroskops wurde evaluiert, ebenso wie die Verwendung von humanem vitalem whole-mount Gewebe für die Immunfluoreszenzfärbung. In einem letzten Schritt wurden verschiedene Behandlungsoptionen an zuvor identifizierten Tumorzellen erprobt.

Zur Durchführung der oben genannten Experimente wurden verschiedene Gewebetypen verwendet: histologische Gefrierschnitte sowie vitales whole-mount Gewebe, jeweils von humanem Pankreaskarzinom- und Pankreasnormalgewebe, das CAM-Assay sowie die Zellkultur. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern anti-EGFR-AK, anti-CD71-AK und anti-CD326-AK, außerdem Zellkernfärbungen mit DAPI oder Hoechst33342 und Anfärbung der Gefäße mit anti-CD31-AK. Die Bildgebung wurde mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop und einem eigens konstruierten faseroptischen Mikroskopie-System durchgeführt.

In histologischen Schnitten des Tumorgewebes gelang eine Darstellung tumorverdächtiger Zellcluster vorrangig mit anti-CD71. Auffällig war hierbei außerdem eine deutliche, wenn auch schwache Anfärbung des Normalgewebes im Vergleich zum Tumorgewebe mit anti-CD326. Im whole-mount Gewebe dagegen war mit anti-EGFR-AK die intensivste Clusterzellendarstellung möglich. Diese starke Anfärbung beschränkte sich allerdings auf ca. 18 % (2/11) der Proben. Bei diesen zeigte sich aber entsprechend eine äußerst hohe verblindete Identifikationsrate von Tumoren nach anti-EGFR-Färbung.

Alle sechs ausgewählten Zelllinien konnten in der Zellkultur angezüchtet, gefärbt und mikroskopisch dargestellt werden. Im CAM-Assay waren nur zwei der sechs erprobten Zelllinien aufgrund von optimaler (fehlender) Autofluoreszenz in-ovo für weitere Untersuchungen geeignet. Auch hier gelang eine Anfärbung und mikroskopische Tumorzellendarstellung mit anti-EGFR-AK und anti-CD71-AK.

Eine Darstellung mit konventioneller und faseroptischer Mikroskopie war bei allen Gewebetypen möglich und in ihrer Wertigkeit vergleichbar. Die lokale Behandlung mit 5-FU bewirkte lediglich eine Tumorreduktion. Nebenbefundlich gelang eine exzellente

Gefäßdarstellung sowohl im konventionellen als auch im faseroptischen Mikroskop mithilfe der anti-CD31-Färbung.

Diese Arbeit zeigt einige neue Erkenntnisse auf. Es konnte eine Eignung von vitalem whole-mount Gewebe für die Immunfluoreszenz gezeigt werden, was für weitere Studien äußerst relevant sein kann. Die faseroptische Mikroskopie, deren Erprobung ebenfalls ein Ziel dieser Arbeit war, ermöglichte ein Imaging in hoher Qualität, vergleichbar mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie. Die Bilddarstellung des WF-FOM zeigte sich maßgeblich von der Fluoreszenzintensität und den verwendeten Antikörpern abhängig. In dieser Studie zeigten sich diesbezüglich nur anti-EGFR(-AY13)-AK und anti-CD31(-WM59)-AK, in-vitro und in-ovo zusätzlich anti-CD71(-CY1G4)-AK geeignet. Eine praktische Anwendung des faseroptischen Mikroskops ist aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse bezüglich Identifikation und Darstellung von Tumorzellen im klinischen Setting durchaus denkbar.

Insgesamt beschreitet diese Arbeit einen Weg, indem eine bereits bestehende Operationstechnik mithilfe moderner Geräte und fortschrittlicher Methoden wie der Fluoreszenzfärbung weiter verbessert werden könnte. So könnte langfristig die Überlebensrate von Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom verbessert und das Risiko von Lokalrezidiven verringert werden.