

Aus dem Institut für Biophysik und Strahlenbiologie
der Universität Hamburg
Direktor Prof. Dr. Horst Jung

Prognostische Relevanz eines gegen
Blasen-Karzinom-Zellen gerichteten Antikörpers

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Melanie Zick
aus Wilhelmshaven

Hamburg, 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 10 April 2001

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. H. Baisch

Korreferent: Prof. Dr. H. Jung

1	EINLEITUNG.....	4
1.1	EPIDEMIOLOGIE.....	4
1.2	RISIKOFAKTOREN.....	4
1.3	SYMPTOME.....	5
1.4	DIAGNOSTIK.....	5
1.5	METASTASIERUNG.....	9
1.6	PATHOLOGIE.....	10
1.7	THERAPIE.....	14
1.7.1	Die transurethrale Elektroresektion.....	14
1.7.2	Die intravesikale Chemotherapie.....	15
1.7.3	Die systemische Chemotherapie.....	16
1.7.4	Stahlentherapie.....	17
1.7.5	Die Zystektomie.....	17
1.8	THERAPIEWAHL.....	18
1.9	PROBLEMATIK DER PROGNOSE UND REZIDIV-FRÜHERKENNUNG.....	20
1.10	ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	MATERIALGEWINNUNG.....	22
2.1.1	Zellkultur.....	22
2.1.2	Blasenspülflüssigkeiten.....	23
2.2	PROBENAUFBEREITUNG.....	23
2.2.1	Zellgewinnung.....	23
2.2.2	Inkubation mit Primärantikörpern 486 und CD45.....	24
2.2.3	Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern.....	24
2.2.4	Aufbereitung zur Messung.....	25
2.3	VERWENDETE MATERIALIEN.....	25
2.3.1	Antikörper.....	25
2.3.2	Lösungen.....	26
2.4	MESSUNG DER PROBEN AM FACSCAN.....	27
2.4.1	Prinzip der Flusszytometrie.....	27
2.4.2	Messung der Zellsuspensionen.....	29
2.4.3	Auswertung und Analyse der Messungen.....	30
2.4.4	Auswertung der dot-plots.....	30
3	ERGEBNISSE.....	32
4	DISKUSSION.....	44
4.1	MATERIAL UND METHODIK.....	44
4.1.1	Zellausbeute bei der Blasenspülung.....	44
4.1.2	Hämorrhagische Proben.....	44
4.1.3	Grenzlinienziehung.....	45
4.1.4	Verlaufskurven.....	45
4.2	ERGEBNISDISKUSSION.....	45
4.2.1	Patientenkollektiv.....	45
4.2.2	Aufschlüsselung nach Untergruppen.....	46
4.2.3	Andere Prognoseparameter.....	48
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	52
6	LITERATURVERZEICHNIS	53
7	ANHANG.....	58
7.1	DANKSAGUNG.....	58
7.2	LEBENS LAUF.....	59

1 Einleitung

Das Urothelkarzinom

1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom macht etwa 3% aller bösartigen Tumore aus und ist der zweithäufigste urologische Tumor in den westlichen Industrienationen mit einer Inzidenz von etwa zwanzig Neuerkrankungen pro 100000/Jahr in Deutschland [35]. Es versterben jährlich tumorbedingt 5000 Patienten in Deutschland und ca.10500 in den USA [11,31]. Das Altersmaximum liegt in der fünften bis siebenten Dekade. Die Geschlechtsverteilung zwischen Frauen und Männern beträgt 1:6 (je nach Literatur bis 1:3) [35,13]. In den industrialisierten Ländern ist die Inzidenz höher als in ländlichen Regionen [13]. Besonders in den letzten Jahrzehnten ist eine Zunahme der Neuerkrankungen zu verzeichnen. Bezogen auf alle Patienten schwankt die Tumormortalität je nach Autor zwischen drei und fünf Prozent bezogen auf das Gesamtkollektiv [4,5].

1.2 Risikofaktoren

Zu den hauptsächlichen Risikofaktoren gehört die Exposition mit Toxinen. Diese erfolgt vor allem im Bereich der chemischen Industrie mit aromatischen Aminen z.B. Benzidin, β -Naphthylamin, 4-Aminodiphenyl [25]. Die aromatischen Amine werden in der Leber hydroxyliert, glukroniert und anschließend renal eliminiert [13]. Die Inaktivierung erfolgt über die N-Acetyltransferase, die aber bei jedem Menschen unterschiedlich schnell acetyliert; je schneller die Acetylierung, desto geringer das Krebsrisiko und umgekehrt [13]. Aber auch in der Textilindustrie und bei Berufsgruppen wie Straßenbauarbeitern, Schornsteinfegern und Arbeitern in Kokereien und in der Druckindustrie erfolgt eine stetige Toxinexposition. Als zivilisatorische Ursache steht in erster Linie der Nikotinabusus (Raucher); ausschlaggebend ist hierbei das 2- β -Naphthylamin. Die Tryptophan-Metabolite werden in der Leber zu Orthoaminophenolen metabolisiert. Danach werden sie mit Sulfat oder Glukuronsäure konjugiert und renal ausgeschieden [25]. Durch die im Urin vorhandene β -Glukuronidase werden mittels Hydrolyse Orthophenole freige-

setzt, die über eine Veränderung der DNS karzinogen wirken [25]. Als weitere zivilisatorische Ursachen kommen chronische Entzündungen der ableitenden Hamwege (Dauerkatheder, Bilharziose) in Frage [13]. Auch Medikamente wie Chlornaphazin (heute nicht mehr verwendet), Phenacetin und Cyclophosphamid wirken kanzerogen [13]. Ein weiterer Zusammenhang besteht zwischen Balkannephropathie und dem Urothelkarzinom, was wahrscheinlich auf einen saprophytischen Pilz im gelagerten Getreide zurückzuführen ist [13].

1.3 Symptome

Charakteristische Leitsymptome des Urothelkarzinoms ist die schmerzlose Makrohämaturie [13], ebenso wie die Mikrohämaturie. Beide Symptome treten nur intermittierend auf. Ein weiteres Symptom sind dysurische Miktionsbeschwerden jenseits des 40. Lebensjahres, wenn sie auf Antibiotikatherapie nicht ansprechen. Erst bei fortgeschrittenen Tumoren treten suprasymphysäre Schmerzen bzw. allgemeine Tumorsymptome auf [25].

1.4 Diagnostik

Zur Diagnostik werden folgende Untersuchungen genutzt:

- Sonographie
- exfoliative Urinzytologie
- Zytoskopie
- Urogramm
- bimanuelle Untersuchung
- transurethrale Resektion
- Computertomographie (CT)
- Kernspintomographie (NMR-Tomographie)

Primär werden nichtinvasive Untersuchungen wie Sonographie zum Ausschluss renaler Ursachen genutzt [13]. Mit Hilfe des Ultraschalls ist die Erfassung der Harnblasenkontur, die Darstellung von Divertikeln und Harnblasentumoren möglich. Über eine transurethral in die Harnblase eingeführte Ultraschallsonde sind auch Aussagen über Grad der Wandinfiltration sowie Tumorausbreitung in den Wandschichten möglich [35].

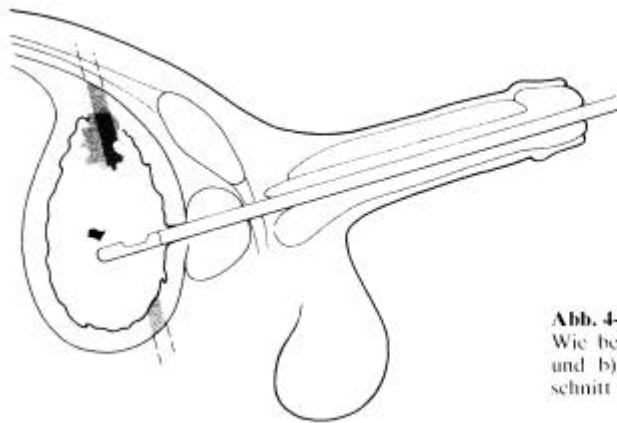


Abb. 4-15. Schema der endovesikalen Sonographie. Wie bei der transrektalen Sonographie (Abb. 4-14a und b) ist eine Darstellung im Quer- und Längsschnitt möglich

aus: Urologie, Alken P. und Walz P., 1998 Seite 77 [1]

Desweiteren eignet sich die exfoliative Urinzytologie. Sie dient der Suche von Tumorzellen im Harntrakt [25]. Dazu wird ein Urinsediment hergestellt, welches z.B. mit Methylblau, HE oder Papanicolaou gefärbt und anschließend fixiert wird. Vor allem bei Urothelkarzinomen und Tumoren, die in die Harnwege einbrechen, ist sie sehr aussagekräftig. Bei Blasentumoren und insbesondere dem Carcinoma in situ ist die Urinzytologie wesentlich sensitiver als alle anderen diagnostischen Verfahren [25]. Mit Hilfe verschiedener Kriterien (Verschiebung der Kernplasmarelation, Prominenz und Irregularität der Kernmembran, Chromatinvermehrung mit Transparentverlust des Zellkerns, Änderung der Chromatinfineinstruktur, Vermehrung und Entrundung der Kernkörperchen, Entrundung und Varianz der Zellkerne) erfolgt eine Einteilung in 5 Grade (nach Papanicolaou) [13].

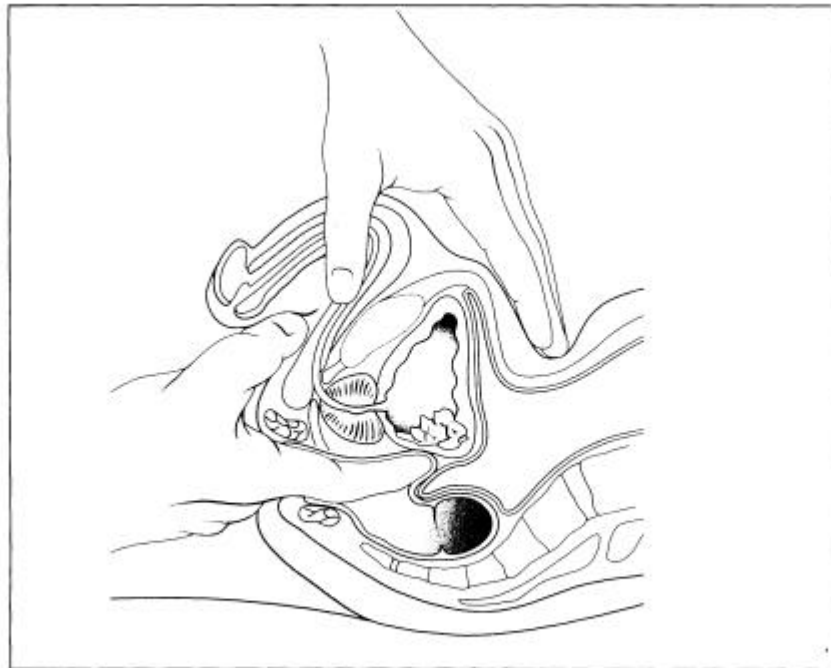
Grad	Sensivität der Urinzytologie
Grad 1 gutartig	10-30 %
Grad 2 gutartig	40-60 %
Grad 3 atypisch	80-90 % (incl. cis)
Grad 4 maligne	
Grad 5 maligne	[13]

Die Zytoskopie ist ein häufig durchgeführtes endoskopisches Verfahren in der Urologie. Sie ist beim Mann immer mit der Urethroskopie kombiniert. Dazu wird zunächst ein Gleitmittel installiert und dann mit einem starren Instrument durch die Harnröhre bis in die Blase vorgegangen. Diese Instrumente sind meist aus Metall und enthalten in ihrem Inneren mehrere Prismen, über die (Kalt-)Licht übertragen werden kann, um die Blase auszuleuchten und die Einsicht in den Hohlraum zu ermöglichen. In der mit Wasser gefüllten, hell erleuchteten Blase sind alle Einzelheiten als direktes aufrechtes Bild gut sichtbar. Das rhythmische Entleerungsspiel der Ostien lässt sich beobachten, Entzündungen der Blasenschleimhaut, Tumore, Steine und Fremdkörper sind gut erkennbar [35].

Zur genauen morphologischen Darstellung des Urogenitalsystems eignet sich das Urogramm. Dieses ist bei Symptomen wie Mikro- oder Makrohämaturie obligat [3,13]. Dabei wird Kontrastmittel intravenös injiziert und 7 bzw. 15 min. später je eine Röntgenaufnahme gefertigt. Auf dieser stellen sich Nierenbeckenkelchsystem, Harnleiter und Harnblase zur Beurteilung dar [35].

Die bimanuelle Untersuchung erfolgt in Narkose. Die Beweglichkeit der Blase kann bei völlig relaxierter Bauchdecke bimanuell (rektal oder rekto-vaginal) beurteilt werden [3]. Palpation größerer Tumore und Abschätzung ihrer Beziehung zur Blasenwand ist so möglich [3]. Für einen infiltrierenden Tumor, der die Blasengrenze bereits überschritten hat, spricht die Fixation der Blase an der Beckenwand [3].

Vergrößerte Lymphknotenpakete können den ersten Hinweis auf eine lymphogene Metastasierung des Tumors geben [35].



G-15: Bimanuelle Untersuchung der Harnblase in Narkose. Durch rektoabdominale (bei der Frau vaginoabdominale) Palpation lassen sich Größe und Beweglichkeit eines Tumors beurteilen

aus: Urologie; Walter Merkle ,1997 Seite 163 [25]

Mittels Computertomographie ist die Harnblase zuverlässig erfassbar [35] und Blasentumore können zumeist identifiziert werden [13]. Ein Vorteil des CT ist der gleichzeitige Überblick über den gesamten Körperquerschnitt, so dass man stets den Zusammenhang mit den benachbarten Organen erhält [35]. Daher kann eine eventuelle Infiltration in benachbarte Organe festgestellt werden [13]. Unter Ausnutzung von Unterschieden der Röntgenabsorption lassen sich Dichteunterschiede feststellen. Raumforderungen ab 0,5-2 cm Durchmesser sind zu erkennen. Bei Tumorverdacht zur Stadieneinteilung von Tumoren sowie zur Abgrenzung von Nachbarschaftsprozessen hat sich die Computertomographie in kurzer Zeit einen festen Platz in der Diagnostik erobert [35].

Die Kernspintomographie ist ein weiteres bildgebendes Untersuchungsverfahren. Dabei wird der Resonanzeffekt zwischen Atomkernen in einem magnetischen Feld und einer elektromagnetischen Welle aus dem Spektralbereich der Rundfunkwellen genutzt.

Die NMR ist praktisch auf den Wassergehalt von Gewebszellen und Körperflüssigkeiten beschränkt, da feste Materie wie Knochen kernspintomographisch nicht abzubilden

sind. In der Urologie zielen derzeitige Untersuchungen dahin, die NMR-Tomographie ersatzweise oder komplementär zur CT einzusetzen, da Längsschnitte angefertigt werden können [3].

Der größte Teil der Karzinome (ca. 80%) wird zum Zeitpunkt der Diagnose als oberflächlich eingestuft und ist also auf die Mukosa (Stadium pTa) oder Lamina propria (Stadium pT1) beschränkt. Sie werden unter kurativer Zielsetzung durch eine transurethrale Elektroresektion bzw. durch eine radikale Zystektomie behandelt. Die weiteren 20 % haben zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in die Harnblasenmuskulatur infiltriert oder sind metastasiert und sind damit für eine konservative Therapie nicht mehr zugänglich.

Nach transurethraler Resektion oberflächlicher Harnblasenkarzinome kommt es in 60-80 % der Fälle innerhalb von 4 Jahren zur Rezidivbildung [8]. Ein Progress der Erkrankung erfolgt bei bis zu 48 % [9,10]. Die Rezidivhäufigkeit korreliert sowohl mit Infiltrationstiefe und Differenzierungsgrad des Tumors als auch mit der Progressions- und Überlebensrate [6].

Eine Sonderstellung nimmt das Carcinoma in situ ein, ein nichtinvasives, flaches Karzinom, das auf das Epithel beschränkt ist. Es kommt sowohl als singulärer Tumor als auch in Kombination mit anderen Blasentumoren vor (sogenanntes assoziiertes Cis). Die Entwicklung ist schwer zu prognostizieren, da das Cis generell auch zur Muskelinvasion und Metastasierung befähigt ist [29]. In 38-83% entsteht aus dem Cis innerhalb von 5 Jahren ein invasiver Tumor [2,20].

1.5 Metastasierung

Die Metastasierung des Urothelkarzinoms erfolgt lymphogen in die obturatorischen Lymphknoten, über extern/intern iliakale und weiter in die lumbalen Lymphknoten. Hämatogen werden Knochen, Leber und Lunge befallen.

1.6 Pathologie

Je höher das Tumorstadium (Infiltrationstiefe) und je höher das Grading desto schlechter die Prognose, wie auch bei multilokulärem Auftreten. Bezogen auf die Therapie ist die Prognose bei konservativen Maßnahmen (transurethrale Elektroresektion) schlechter als bei radikalchirurgischen Maßnahmen; diese führen jedoch zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität [35].

Die Tumormortalität bezogen auf alle Patienten schwankt je nach Autor zwischen drei und fünf Prozent bezogen auf das Gesamtkollektiv [4,5] .

Tumorstadium	5-Jahresüberlebensrate
pTa-pT1 (superfizielle Tumoren)	65-79%
pT2-pT3a (muskelinvasive Tumoren)	30-40%
pT3b	5-20%
pT4	0-6%
N1-3/M1	0%

Tab. 1: 5-Jahresüberlebensrate nach radikaler Zystektomie in Korrelation zur Ausdehnung der Blasentumor-Erkrankung [30]

Die Invasionstiefe des Tumors in die Blasenwand ist ausschlaggebend für die Klassifikation. Die genaue Bestimmung erfordert folgende Untersuchungen: Urogramm mit Blasendarstellung, Zytoskopie mit Biopsie oder transurethraler Resektion des Tumors, bimanuelle Untersuchung, biochemischer Nachweis von Fernmetastasen, CT und evtl. intrakavitäre Sonographie.

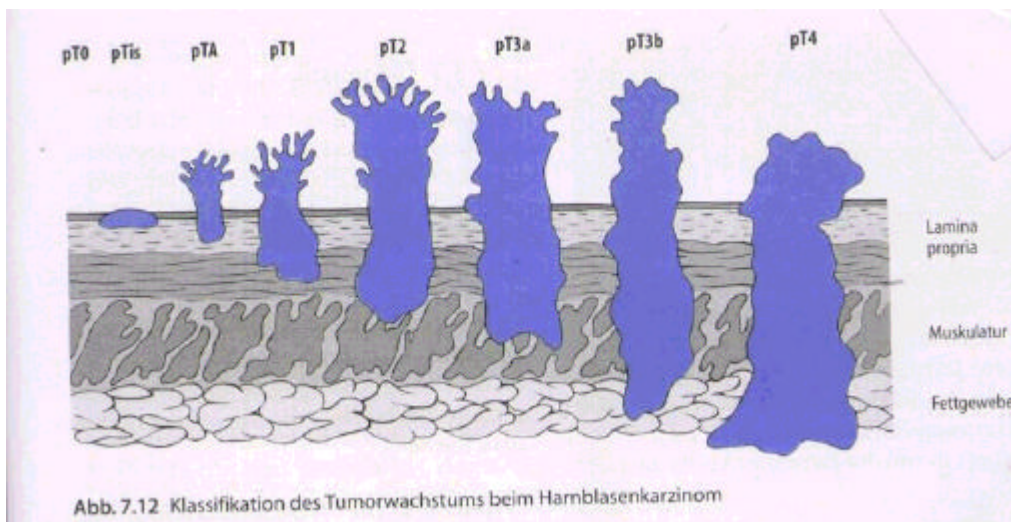
Die Bewertung in dem hier vorgestellten Patientenkollektiv orientiert sich an der internationalen Einteilung von Krebserkrankung des von der Union International Contre le Cancer entwickelten TNM-Systems.

T = lokale Ausdehnung des Tumors gemäß klinischer und bioptischer Untersuchung

Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ, präinvasives Karzinom
Ta	papilläres noninvasives Karzinom
T1	Invasion der Basalmembran (Lamina propria)
T2	Tumor mit Invasion der oberflächlichen Muskulatur
T3	Tumor mit Invasion der tieferen Muskulatur oder des periveskulären Gewebes
T3a	Befall der tiefen Muskulatur
T3b	Infiltration des periveskulären Gewebes
T3bi	mikroskopische Infiltration des periveskulären Gewebes
T3bii	makroskopische Infiltration des periveskulären Gewebes
T4	
T4a	Infiltration von Prostata oder Uterus oder Vagina
T4b	Infiltration von Becken- oder Bauchwand

Außerdem können folgende Zusätze verwendet werden:

is	assoziiertes Carcinoma in situ
m	multiple Läsionen
p	histopathologische Einstufung des Tumors



aus: Urologie, Hautmann Huland, Springer Verlag, 1997, S. 201 [13]

N = regionärer Lymphknotenbefall

- Nx Beurteilung der regionären Lymphknoten nicht möglich
- N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase in einem regionären Lymphknoten, im größten Durchmesser $\leq 2\text{cm}$
- N2 Befall eines solitären Lymphknoten (Durchmesser größer 2cm und $\leq 5\text{cm}$)
- N3 Befall von Lymphknoten mit mehr als 5cm im größten Durchmesser

M = Metastasierung

- Mx keine Beurteilung der Metastasen möglich
- M0 keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen

Mit Indices (z.B. oss, pul, hep etc.) sollte die Metastasenlokalisation angezeigt werden

G = Differenzierungsgrad

- G0 Papillom, keine Evidenz einer Anaplasie
- G1 hoher Grad der Differenzierung
- G2 mittlerer Grad der Differenzierung
- G3 geringer Grad der Differenzierung
- G4 anaplastisches Karzinom (undifferenziert)

R = Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumoren nach Behandlung

- Rx Residualtumor kann nicht beurteilt werden
- R0 kein Residualtumor
- R1 histologischer Residualtumor
- R2 makroskopischer Residualtumor

Eine weitere gebräuchliche Einteilung ist die des American Joint Comitte Against Cancer (AJCC)

Stage 0a	Ta, N0, M0
Stage 0is	Tis, N0, M0
Stage 1	T1, N0, M0
Stage 2	T2, N0, M0
Stage 3	T3a, N0, M0 T3b, N0, M0 T4a, N0, M0
Stage 4	T4b, N0, M0 Jedes T, N1, M0 Jedes T, N2, M0 Jedes T, N3, M0 Jedes T, jedes N, M1

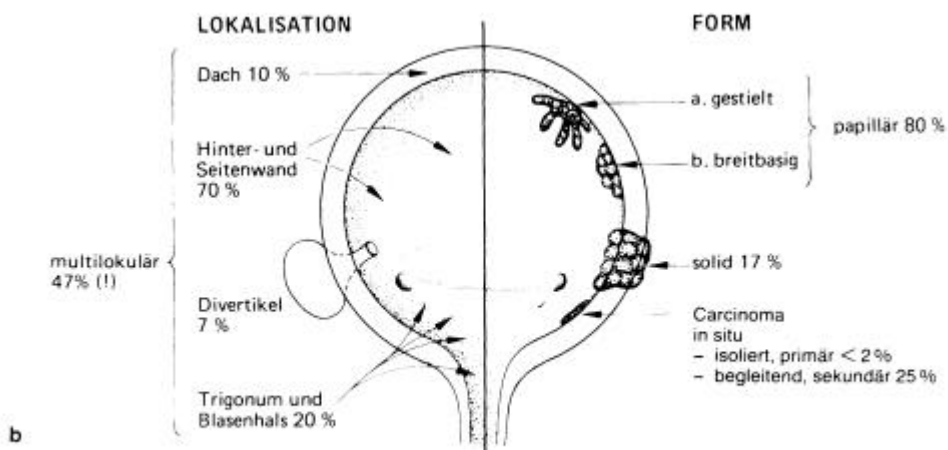


Abb. 7.15a,b a Divertikelkarzinom der Blase.
b Lokalisation und Form der Blasentumoren.

aus: Urologie, Altwein J., Rübben H.,1993, Seite 196 [3]

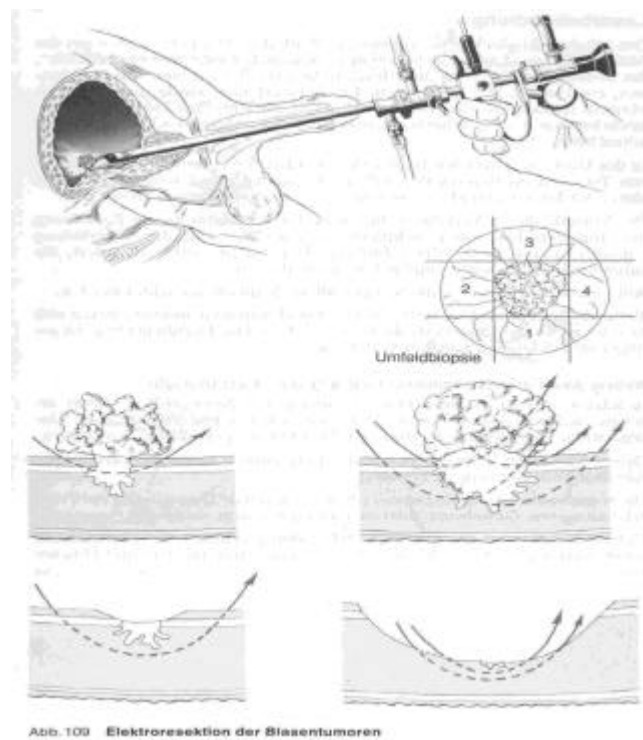
1.7 Therapie

Zur Therapie des Harnblasenkarzinoms gibt es verschiedene Behandlungsmöglichkeiten wie z.B. transurethrale Elektroresektion, lokale Chemotherapie mit Zytostatika, in Ausnahmefällen Blasenteilresektion, Radiotherapie und Zystektomie mit Harnableitung in den Darm. Sie werden kombiniert oder auch als Monotherapie eingesetzt. Die einzuschlagende Therapie wird bestimmt durch Alter, Stadium, Malignitätsgrad und allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten [3].

1.7.1 Die transurethrale Elektroresektion

Bei der transurethralen Resektion (TUR) wird der Tumor endoskopisch unter Sicht mit einer Hochfrequenzstrom führenden Schlinge abgetragen. Dabei wird auch eine Probe vom Tumorrand und vom Tumorgrund entnommen und zur histologischen Untersuchung genutzt [1].

In der folgenden Abbildung wird das Prinzip der TUR dargestellt.



aus: Urologie, Sökeland, 1987 Seite 147 [35]

1.7.2 Die intravesikale Chemotherapie

Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die intravesikale Chemotherapie mit Epirubicin, Mitomycin, Doxorubicin oder die Immuntherapie mit BCG (Bacillus-Calmette-Guerin). Diese Substanzen senken die Rezidivquoten und Rezidivintervalle, eine Progression wird jedoch nicht verhindert [25]. Daher sind auch bei dieser Therapie regelmäßige endoskopische Kontrollen unerlässlich.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die intravesikale Anwendung und Dosierung von Chemotherapeutika.

Tabelle 16.12 Intravesikale Anwendung und Dosierung von Chemotherapeutika.

Substanz	Dosierung
Mitomycin C	20–40 mg/20 ml NaCl
Epirubicin	40–60 mg/50 ml NaCl
Doxorubicin	50–80 mg/50 ml NaCl

Anwendungsschema	
Start:	2–4 Wochen nach TUR
Intervall:	4–6 x/wöchentlich • monatlich
Gesamtdauer:	6–12 Monate

aus: Jens E. Altwein, Herbert Rübben, Urologie, 1993 Seite 428 [3]

Doxorubicin und Mitomycin C und Epirubicin sind systemisch nicht wirksam; sie sind äquieffektiv und werden aufgrund ihres Molekulargewichtes nicht resorbiert [3]. Die intravesikale Verweildauer beträgt 1-2 Stunden, eine Langzeitbehandlung von mehr als einem Jahr hat sich nicht als überlegen erwiesen. Nebenwirkungen wie allergische Reaktionen, Miktionsbeschwerden, Hämaturie oder spätere Harnröhrenstriktur können auftreten. Die intravesikale Therapie wird von ca. 10% der Patienten aufgrund lokaler Beschwerden abgebrochen. Nach Therapieende bilden sich die lokalen Beschwerden in der Regel zurück [3].

Beim Einsatz von BCG zeigten mehrere Studien eine Verlängerung des rezidivfreien Intervalls und eine Verminderung der Progressionsrate.

Die Nebenwirkungen jedoch reichen von der chemischen Cystitis [36] bei bis zu 91 % der Patienten, über Myelosuppression [16] bis hin zur BCG-Sepsis (0,4% der Patienten) [7].

1.7.3 Die systemische Chemotherapie

Die systemische Chemotherapie erfolgt mit methotrexat- und cisplatinhaltigen Kombinationen. Die Nebenwirkungen sind substanzspezifisch, dosisabhängig und nehmen mit der Summe der kombinierten Chemotherapeutika zu [3].

Eine relativ geringe Nebenwirkungsrate bei vergleichbarer Effektivität besteht bei der Zweierkombination von Cisplatin und Methotrexat [3].

Tabelle 16.13 Systemische Chemotherapie des metastasierten Urothelkarzinoms mit Cisplatin und Methotrexat.

Substanz	Dosierung	Applikation
Cisplatin	70 mg/qm	Tag 1
Methotrexat	40 mg/qm	Tag 1, 15

Wdh. nach 28 Tg.

aus: Jens E. Altwein, Herbert Rübber, Urologie, 1993 Seite 428 [3]

Eine Polychemotherapie mit vier verschiedenen Zytostatika z.B. nach dem MVAC-Schema hat erheblich größere Nebenwirkungen. Zu diesen zählen z.B. Sepsis, Mukositis, Myelosuppression und Kardiotoxizität [3].

Tabelle 16.14 Polychemotherapie des metastasierten Urothelkarzinoms nach dem MVAC-Schema.

Substanz	Dosierung	Applikation
Methotrexat	30 mg/qm	Tag 1, 15, 22
Vinblastin	3 mg/qm	Tag 2, 15, 22
Doxorubicin	30 mg/qm	Tag 2
Cisplatin	70 mg/qm	Tag 2

Wdh. nach 28 Tg.

aus: Jens E. Altwein, Herbert Rübber, Urologie, 1993 Seite 429 [3]

Eine erneute Diagnostik erfolgt nach 2 Zyklen. Es können 2 weitere Therapiezyklen erfolgen, wenn eine subjektive Besserung oder eine komplette Remission stattgefunden hat. Ansonsten ist eine weitere Behandlung mittels supportiver Maßnahmen notwendig [3].

1.7.4 Strahlentherapie

Bei der externen Radiotherapie werden die Blasenregion und die pelvinen Lymphknoten transkutan mit 50-60 Gy bestrahlt. Die Nachteile sind radiogene Spätschäden wie Schrumpfblass oder Strahlenproktitis; demgegenüber steht der Vorteil der Organerhaltung. Allerdings sind ca. 45% der Patienten sogenannte „non-responder“, d.h. sie weisen histologisch noch einen Resttumor auf. In diesem Fall sollte eine Nachbehandlung in Form einer Salvage-Zystektomie (operative Blasenentfernung post radiationem) stattfinden [1].

Das organerhaltende Verfahren der Radiotherapie kann aufgrund der geringeren Langzeit-Überlebensrate und gefürchteter Nebenwirkungen nicht systematisch bei Patienten mit ansonsten hoher Lebenserwartung und geringerem Operationsrisiko eingesetzt werden [13].

Die interstitielle Radiotherapie beinhaltet die operative Einpflanzung von Strahlenträgern (Jod, Iridium, Gold) in die Blase. Die bisherigen Ergebnisse dieser Therapie sind bei lokalem Wachstum besser als bei der externen Hochvolttherapie [3].

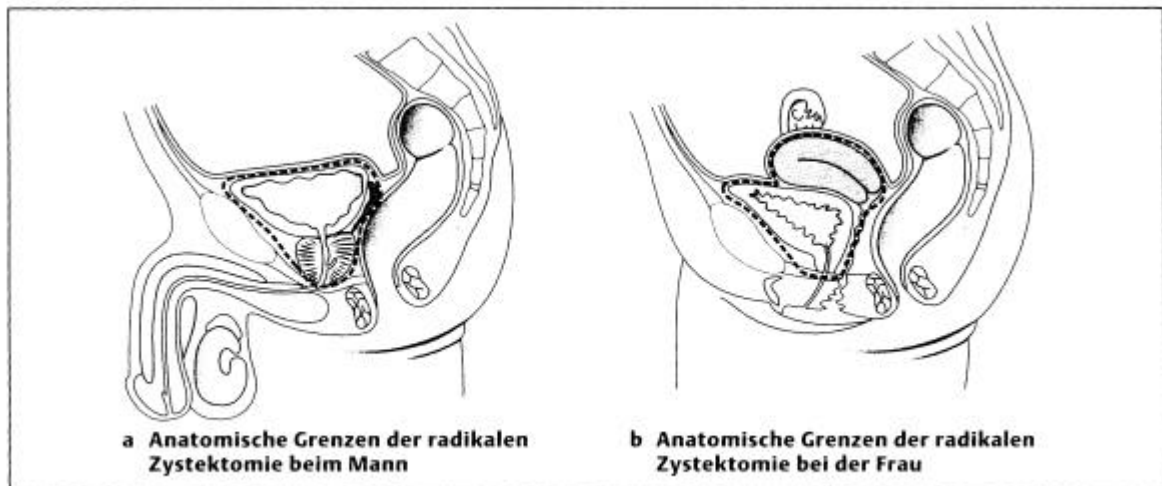
Bei der kombinierten Chemo-Radiotherapie werden außer Bestrahlung auch Zytostatika gegeben z.B. Cisplatin oder Adriamycin. Man erhofft sich dabei eine Potenzierung der Therapeutika [13]. Diese Therapie stellt eine gute alternative Behandlungsform für Patienten dar, die ein zu großes Operationsrisiko oder eine ansonsten nur geringere Lebenserwartung haben [13].

1.7.5 Die Zystektomie

Bei Männern beinhaltet die radikale Zystektomie die kurative Entfernung von Harnblase, Prostata, sowie distaler Harnleiter. Da bei Tumorlokalisation in der prostaticen Harnröhre oder am Blasenausgang prinzipiell Tumorrezidive in der verbleibenden Harnröhre auftreten können (Häufigkeit ca. 10%) wird in diesen Fällen auch eine Urethrektomie notwendig [25].

Bei Frauen beinhaltet die radikale Zystektomie die kurative Entfernung von Harnblase, Harnröhre, Gebärmutter, Adnexe (sofern aufgrund des Alters indiziert) sowie distaler Ureter [25].

Nach der radikalen Zystektomie gibt es verschiedene Möglichkeiten der Harnableitung. Zum einen kann die Harnableitung mittels Ileum-Conduit oder Kolon-Conduit erfolgen oder über eine Ersatzblasenkonstruktion aus Dünn- und Dickdarm (Typ Mainz-Pouch, Typ Ileum-Neoblase) wobei die Miktion dann durch die Bauchpresse erfolgt [25].



G-18 a, b: Resektionsgrenzen bei radikaler Zystektomie

aus : Urologie, Walter Merkle S. 166 [25]

1.8 Therapiewahl

Bei den meisten Patienten mit einem oberflächlichem Harnblasenkarzinom (Tis, Ta, T1, N0, M0) erfolgt zunächst eine kurative Behandlung durch transurethrale Resektion des Karzinoms. Bei Ta-Tumoren aller Malignitätsgrade überleben 92 % der Patienten 5 Jahre [3]. Aber aufgrund der hohen Rezidivquote erfolgt eine engmaschige endoskopische Kontrolle in Abständen von 3 Monaten. Bei einem T1-Tumor mit dem Malignitätsgrad G3 ist die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch 60 %. Dieses Karzinom weist in 22 % Metastasen auf und bei einem Drittel der Patienten entwickelt sich ein muskelinfiltrierender Tumor. Daher ist bei hohem Malignitätsgrad ca. 6 Wochen nach dem Ersteingriff eine Nachresektion obligat [3]. Die Rezidivprophylaxe kann auch medikamentös erfolgen. Dann wird z.B. Mitomycin alle 2 Wochen für 6 Monate in die Blase instilliert. Eine Bestrahlung als Rezidivprophylaxe hat sich nicht bewährt [13].

Bei Patienten mit einem infiltrierenden Tumor (T2-3, N0, M0) erfolgt zunächst eine TUR zum histologischen Nachweis der Muskelinfiltration. Wird diese bestätigt, dann ist eine radikale Zystektomie indiziert [3]. Die ehemals hohe Mortalität dieser Eingriffe von 10 % ist auf 2-3% zurückgegangen [13].

Bei pathologischer Bestätigung des T2-Stadiums (N0, M0) beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nach o.g. Therapie 80 %; bei T3-Tumoren 50-60 % [13]. Bei Patienten mit invasiven Tumoren (Stadium T3 und größer) und Regional- oder Fernmetastasen ist eine Heilungschance zumeist nicht gegeben. Die weitere Verfahrensweise orientiert sich dann am jeweiligen histologischen Stadium.

Bei Patienten mit fortgeschrittenem Karzinom (T4, N1-3, M1) ist eine kurative Therapie kaum möglich. Die Behandlung besteht vor allem in der systemischen Chemotherapie [3]. Die Kombination von Methotrexat und Cisplatin mit zusätzlich Adriamycin und Vinblastin (MVAC-Schema) oder mit Vinblastin alleine (CMV-Schema) haben zu Remissionsraten von 50-70 % geführt [13]. Die Hälfte dieser Remissionsraten sind komplette Remissionen. Die Langzeit-Überlebensrate beträgt damit 15-20 % [13].

Tabelle 7.12 Prognose des Urothelkarzinoms in Abhängigkeit von Tumorstadium und Tumorgrad.

Tumor	Stadium	Rezidive	Metastasen bzw. Progression	5-Jahres- Überlebens-Rate
oberflächlich	T _{a-1} , G ₁₋₂ , N ₀ , M ₀	40–60 %	0 – 5 %	> 90 %
oberflächlich aggressiv	T _{a-1} , G ₃ , N ₀ , M ₀	> 70 %	> 30 %	60–75 %
invasiv (n. Zystektomie)	T _{2-3a} , N ₀ , M ₀	–	20–55 %	35–65 %
fortgeschr./metastasierend	T _{3b-4} , N ₁ , M ₁	–	> 60 %	< 20 %

aus: Jens E. Altwein, Herbert Rübben, Urologie, 1993 Seite 203 [3]

1.9 Problematik der Prognose und Rezidiv-Früherkennung

Die bisher benutzten konventionellen Prognoseparameter (Primärtumorstadium, Tumorgrad, Multifokalität, rezidivfreies Intervall) haben sich für eine frühe und definitive Therapieentscheidung (radikale Operation versus transurethrale Resektion mit oder ohne anschließende Instillation) als nicht ausreichend erwiesen. Eine solche Therapieentscheidung wäre für die Patienten sehr wertvoll, da derzeit trotz Instillationstherapie 40 % aller behandelten Patienten ein Rezidiv erleiden und 14 % einen Tumorprogress. Desweiteren werden 40 % der Patienten, die eine intravesikale Therapie erhalten, unnötig behandelt, da in einer unbehandelten Kontrollgruppe dieser Prozentsatz ebenfalls rezidivfrei bleibt (Lamm, 1992).

Eine mögliche Erklärung für die unzureichenden Prognosefaktoren könnte sich dadurch ergeben, dass diese meist über die Beurteilung des Primärtumors definiert sind. Dabei könnte gerade bei Blasenkarzinomen das makroskopisch normale Urothel außerhalb des Tumors für Tumorentstehung und Rezidive von Bedeutung sein. Dementsprechend scheint es sinnvoll die Prognose für Tumorrezidive nicht nur aus der Analyse des entnommenen Tumormaterials der Blase zu erstellen, sondern aus der Analyse des umliegenden „normalen“ Gewebes.

Da ständige Biopsien aus der Schleimhaut im Rahmen eines follow-up ohne Tumornachweis nicht vertretbar sind, bietet die Blasenpülzytologie eine Möglichkeit Urothelzellen ohne invasiven Eingriff zu untersuchen. Besonders geeignet scheint dafür der monoklonale Antikörper 486 p3/12, der Anfang der achtziger Jahre als einer von drei moAks in einer Arbeitsgruppe um Professor Hulan getestet wurde. Mit dessen Hilfe konnten Urothelareale identifiziert werden, die mit herkömmlichen Methoden nicht erfasst wurden aber für die Prognose von Tumorrezidiven von entscheidender Bedeutung sein könnten.

Da dieser Antikörper aber nicht tumorspezifisch ist, wurde eine Quantifizierung (QUIC= quantitative Urinimmunzytologie) der positiven Zellen in der Urinzytologie durchgeführt und auf diese Weise eine Identifizierung der Tumorpatienten im Vergleich zum Normalkollektiv erreicht.

Der positive Vorhersagewert der Urinimmunzytologie betrug bei Grad 1- und Grad 2-Tumoren nahezu 90 %, bei Grad 3-Tumoren nur 79 %. Diese Methode wurde auch mit anderen Antikörpern von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich reproduziert (Fradet et al.

1987, Fradet et al. 1990, Huland et al. 1991). Unabhängig von der Wahl des moAk's ist die Spezifität der quantitativen Urinimmunozytologie schlecht (Huland et al. 1991), insbesondere bei Patienten mit unspezifischen Reizzuständen der Blase oder Urolithiasis.

1.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen einer Multicenterstudie des UKE werden Blasenkarzinompatienten mit intravesikal appliziertem Mitomycin C oder BCG oder rekombinantem Interleukin 2 behandelt. Durch Blasenspülungen werden Blasenkarzinomzellen zum Zeitpunkt der Diagnose und während der Verlaufskontrolle gewonnen, die mittels Flusszytometrie mit dem Antikörper 486p 3/12 analysiert werden. Die Aufarbeitung und Messung erfolgt nach der Standardmethode, wie sie von G. Steinfurth entwickelt wurde (Steinfurth G., 2000). Da der 486pAK auch auf Leukozyten exprimiert wird, wurde CD 45 Antileukozyten-Antikörper zur Identifizierung der Leukozyten eingesetzt.

Der klinische Verlauf der Patienten wird auf Korrelation zur flusszytometrischen Messung untersucht. Dabei würde man nach erfolgter Resektion eine stark erniedrigte Expression des Antikörpers erwarten, die der Expression bei Normalzellen entsprechen sollte. Ein Ansteigen der Expression während des follow up würde dann auf ein Rezidiv hindeuten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialgewinnung

2.1.1 Zellkultur

Die Zellkultur 486 p, eine Karzinomzelllinie, wurde uns von der Urologischen Klinik des UKE zur Verfügung gestellt. Sie stammt ursprünglich aus dem Sloan Kettering Institute for Cancer Research, Rye, N.Y..

Die Zellen wurden zunächst in RPMI-Medium in Gewebekulturflaschen (Flaks) als Mono-Layer angezüchtet und zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:3 wie folgt gesplittet. Alle Vorgänge des Splittens wurden mit sterilen Pipetten und in einer Fallstrom-Werkbank vorgenommen. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und verworfen. Dann wurde in die Flaschen 5ml Trypsin (vorher bei 37°C warmgestellt) pipettiert, das nach einer Minute Einwirkzeit ebenfalls abgesaugt wurde. Die Flasks wurden für 7-10 Min. in den Brutschrank gelegt, damit sich die Zellen vom Gefäßboden lösen. Dass dieses erfolgt ist, lässt sich mikroskopisch überprüfen, wenn sich die Zellen nicht mehr sternförmig sondern kugelförmig darstellen. Die Zellen wurden nun in 5ml RPMI (vorher bei 37°C warmgestellt) aufgenommen und jeweils 1 ml davon in eine neue mit 20 ml RPMI gefüllte Flasche pipettiert. Die Flaschen mit den gesplitteten Zellkulturen wurden dann im Brutschrank bei 37 °C aufbewahrt.

Außerdem isolierten wir Leukozyten aus Buffycoat (zur Verfügung gestellt von der Abteilung für Transfusionsmedizin des UKE) nach der folgenden Methode:

Zu 5ml Buffycoat wurden 5ml Dextran gegeben und gut gemischt (Dextran = Oncovertin, 500ml Infusionsflasche). Anschließend ließen wir die so angesetzte Mischung bei Raumtemperatur 30 Min. stehen. Die Erythrozyten setzten sich als Bodensatz ab, während sich die Leukozyten im oberen Anteil ansammelten. Der entstehende Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und mit kalter Ammoniumchloridlösung (Ansatz NH_4CL -Lsg.: 8mg/ml) im Überschuss versetzt und für 10 Min zum Inkubieren im Kühlschrank aufbewahrt.

Darauf erfolgte eine Zentrifugation bei 200g für 10 Min. Das hierbei entstandene Sediment aus Granulozyten und anderen Leukozyten konnte nun zur weiteren Verarbeitung verwendet werden. Sollten die noch vorhandenen Erythrozyten hierbei nicht hinreichend lysiert worden sein, wurde der Waschvorgang mit Amoniumchlorid erneut durchgeführt.

2.1.2 Blasenspülflüssigkeiten

Die Entnahme der Blasenspülflüssigkeit erfolgte präoperativ sowie im Rahmen der routinemäßigen follow-up Untersuchungen in Abständen von 3 Monaten. Die Blase wurde über einen liegenden Katheder mittels einer Blasenspritze ausgiebig (ca. 10x) mit Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gespült und 200 ml Spülflüssigkeit für weitere Untersuchung mittels Flusszytometrie gewonnen. Die Katheterisierung stellt in diesem Fall eine geeignete Möglichkeit der Gewinnung von Urothelzellen dar, da sie keinen invasiven Eingriff beinhaltet. Die Anlieferung aus den auswärtigen Kliniken erfolgte mittels Kurierdienst bzw. durch unsere Studienkoordinatorin noch am selben Tag. Die Proben konnten dann nach unseren Erfahrungen maximal drei Tage im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und anschließend weiterverarbeitet werden.

2.2 Probenaufbereitung

2.2.1 Zellgewinnung

200ml Blasenspülflüssigkeit wurden auf vier Zentrifugenröhrchen zu je 50ml aufgeteilt und dann bei 2000 U/Min für 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde anschließend abgesaugt und verworfen. Das verbliebene Sediment wurde in 20ml Hanks-Lösung aufgenommen und in vier Reagenzgläser zu je 5ml überführt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 200g. Danach wurde wieder der Überstand abgesaugt. Das Zellsediment wurde mit 3ml Hanks-Lösung suspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 200µl dieser Suspension in 9,8 ml NaCl-Lösung

aufgenommen und am Coulter-Counter mit der Stufe 4 (Sensivität) für normale und der Stufe 8 für hämorrhagische Proben gemessen. Diese Messung erfolgte zweimal und die beiden Ergebnisse der Zellzahl wurden gemittelt. Danach wurde die 10^5 Zellen entsprechende Menge an Zellsuspension errechnet und in je ein Reagenzglas für die Positiv- bzw. Negativprobe pipettiert. Anschließend wurden die so aufbereiteten Proben bei 200g für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die von uns verwendeten Parameter für die Zentrifugation und das Aufarbeiten der Proben ermittelte G. Steinfurth in Versuchen anhand der Blasenkarzinomzellkultur p486/12 (Steinfurth G., 2000).

2.2.2 Inkubation mit Primärantikörpern 486 und CD45

Zum Zellsediment mit 10^5 Zellen wurden nun 100µl des Antikörpers p486/12 gegeben. Bei dem Antikörper p486 handelt es sich um einen monoklonalen anti-Human-Mouse-IgM, der mit einem Glycoprotein auf der Oberfläche von Transitionalzellkarzinomzellen reagiert. Zur Markierung von Granulozyten und anderen Leukozyten wurden 10 µl des Antikörpers CD45 hinzugefügt. Beide Antikörper wurden unverdünnt angewandt. Die korrespondierenden Kontrollproben wurden mit 110µl PBA versetzt und gründlich gemischt. Nun wurden die Proben bei 4°C für 8-24 h inkubiert.

2.2.3 Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern

Nach der Inkubation wurden zu jeder Probe 100µl PBA gegeben. Nach guter Durchmischung wurden die Proben 5 min. bei 200g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Diese „Waschung“ wurde anschließend mit 150µl PBA wiederholt. Auf diese Weise wurden nicht gebundene Antikörper ausgewaschen. Zur Markierung des an die Tumorzellen gebundenen Antikörpers p486/12 mit einem Fluorchrom verwendeten wir Cy-3 (siehe auch verwendete Materialien). Zu jeder Probe wurden daher 50µl dieses Antikörpers hinzugefügt und gut gemischt (dieser Antikörper wurde vorher 1:10 mit PBA verdünnt). Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation der Proben für 8-24 h bei 4°C.

2.2.4 Aufbereitung zur Messung

Nun wurde der nicht gebundene Anteil an Antikörper CY-3 durch zweimaliges Waschen mit PBS-Lösung entfernt. Im ersten Waschschrift wurden 100µl PBS hinzugefügt, gründlich gemischt und anschließend bei 200g für 5min. abzentrifugiert, der Überstand abermals abgesaugt und verworfen. Der zweite Waschschrift erfolgte analog mit 150µl PBS. Das nach der Zentrifugation gewonnene Sediment wurde in 350µl PBS aufgenommen, durch ein 53µm- Netz gefiltert und zur Messung in Facscan Röhrchen überführt.

2.3 Verwendete Materialien

2.3.1 Antikörper

1990 wurden in einer Arbeitsgruppe von Prof. Huland drei monoklonale Antikörper gegen Urothelkarzinomzellen hergestellt. Dazu gehört auch der von uns verwendete monoklonale Antikörper p 486/12 . Dieser Antikörper zeigt keine Kreuzreaktivität mit Blutgruppen-Antigenen wie AB0, Rhesus, Lewis, Kell, Lutheran und P1. P486/12 ist ein IgM Antikörper und identifiziert membrangebundene Glykoproteine [18]. Er reagiert mit Normalgewebe (Urothelzellen von Gesunden, Epidermis, Nierengewebe, fetale Harnblase, Magenschleimhaut, Parotis und Brustdrüsengewebe) in unterschiedlicher Intensität. Er ist nicht karzinomspezifisch, aber ein auf Tumoren verstärkt expremiertes Antigen wird von ihm erkannt [17]. Auffällig stark reagiert p 486/12 mit Granulozyten. Die Ähnlichkeit mit CEA als onkofetalem Antigen ist hoch, obwohl die p486 Zelllinie mit CEA-Antikörpern nicht reagiert und auch beim CEA keine Kreuzreaktivität mit Granulozyten besteht [33]. Das p486/12 Antigen wird verstärkt expremiert im Urothel aus der Umgebung invasiver Harnblasenkarzinome. Aufgrund seiner Paraffingängigkeit kann p 486/12 auch an Routinepräparaten in der Pathologie eingesetzt werden. Zur Fluoreszenzmarkierung des p 486/12 wurde der CY-3-Antikörper der Firma Jackson-Immuno-Research verwendet. Der CY-3-Antikörper ist ein mit Fluoreszenzfarbstoffen markiertes Anti-Mouse-IgM. Er emittiert im Rotbereich. Da p 486/12 auffällig mit

Granulozyten reagiert, benutzen wir zu deren Markierung den Antikörper CD 45 der Firma Dianova. Dies ist ein anti human Pan Leukozyten Maus IgG1-Antikörper, der mit FITC konjugiert ist. Am Facscan wird dieser Fluoreszenzfarbstoff bei der Messung vom Grünkanal erfasst.

2.3.2 Lösungen

Hank's

4000mg NaCl E. Merck, Darmstadt

2000mg KCl E. Merck, Darmstadt

30mg KH_2PO_4 E. Merck, Darmstadt

24mg Na_2HPO_4 E. Merck, Darmstadt

500mg Glucose E. Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose (Monohydrat)

500ml H_2O dest.

PBA (1%)

1g Bovines-Serum-Albumin (BSA) Sigma-Aldrich Chemie
GmbH, Steinheim

in 100ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gelöst

NH_4Cl – Lösung

Sonstige Materialien

Reagenzgläser

Einmal-Pipetten (3ml Transfer Pipetten, Falcon, Becton Dickinson and Company)

Facscan-Röhrchen (Polystyrenreagenzglas mit Rundboden (ohne Verschuß) steril, gamma-bestrahlt, Einwegartikel, Falcon, Dickinson and Company)

50ml Zentrifugenröhrchen mit Deckel (Firma Falcon)

50µ-Netz

Einmalpipettenspitzen (steril, Firma Braun)

Gewebekulturflaschen (Flasks) 250 ml (Cellstar)

2.4 Messung der Proben am Facscan

Nachdem die Proben wie oben beschrieben aufbereitet worden waren, führten wir die Messungen an einem Facscan der Firma Becton Dickinson durch. Zur weiteren Analyse benutzten wir die Facscan-Research-Software sowie das Programm WINMDI.

2.4.1 Prinzip der Flusszytometrie

Ein Durchflusszytometer ist ein optisches Messsystem, das Streulicht und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert. Die in einer Suspension enthaltenen Zellen bzw. Zellbestandteile werden linear am optischen Analysepunkt vorbeigeleitet und dort von einem fokussierten Lichtstrahl (Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm) beleuchtet. Das optische Detektionssystem und die Elektronik quantifizieren die Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle. Fluoreszierende Verbindungen (Fluorochrome) absorbieren Lichtenergie über einen vergleichsweise weiten, für sie jeweils charakteristischen Wellenbereich [32].

Diese Energie hebt die Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Rücksprung zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Dieser als Fluoreszenz bezeichneter Strahlenübergang kann durch Photodioden bzw. Photomultiplier erfasst werden. Die

Differenzierung verschiedener Zellen erfolgt durch eine Mehrfarbenfluoreszenzmessung. Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich ($0-10^\circ$) des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter, FSC), ein geringerer Teil des Lichts streut seitwärts (90°) dazu (Seitstreulicht, Side Scatter, SSC). Da die Bildung der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung auf unterschiedlichen Eigenschaften der Zellen beruht, liefert sie dadurch auch unterschiedliche Informationen [32]. Der FSC ist sensitiv für die Querschnittsfläche der gemessenen Partikel und gibt Information über die Zellgröße. Der SSC ist sensitiv für den Refraktionsindex und liefert Angaben über die Zellgranularität, die Membranfaltung sowie die äußere Form [32]. Für jede einzelne Zelle werden Vorwärtsstreuung, Seitwärtsstreuung und bis zu drei Fluoreszenzintensitäten gemessen und gespeichert. Die Verstärkung kann für alle Parameter linear und logarithmisch eingestellt werden. Schließlich ergibt sich für eine Probe aus der Summe vieler aufeinanderfolgender Einzelmessungen das Gesamtergebnis, das in Form von dot-plots für zwei Parameter oder in Form von Histogrammen für einen Parameter dargestellt werden kann.

Der Vorteil des Facscan liegt vor allem darin begründet, dass bei der Erfassung der Daten mehrere, voneinander unabhängige Parameter erfasst werden können und die ursprüngliche Korrelation der Daten für eine spätere Auswertung erhalten bleibt. Die einzelnen Messdaten werden als Listendatei erfasst, d.h. der Computer speichert die Werte aller Parameter in der Reihenfolge, in der die Zellen die Messzelle passieren.

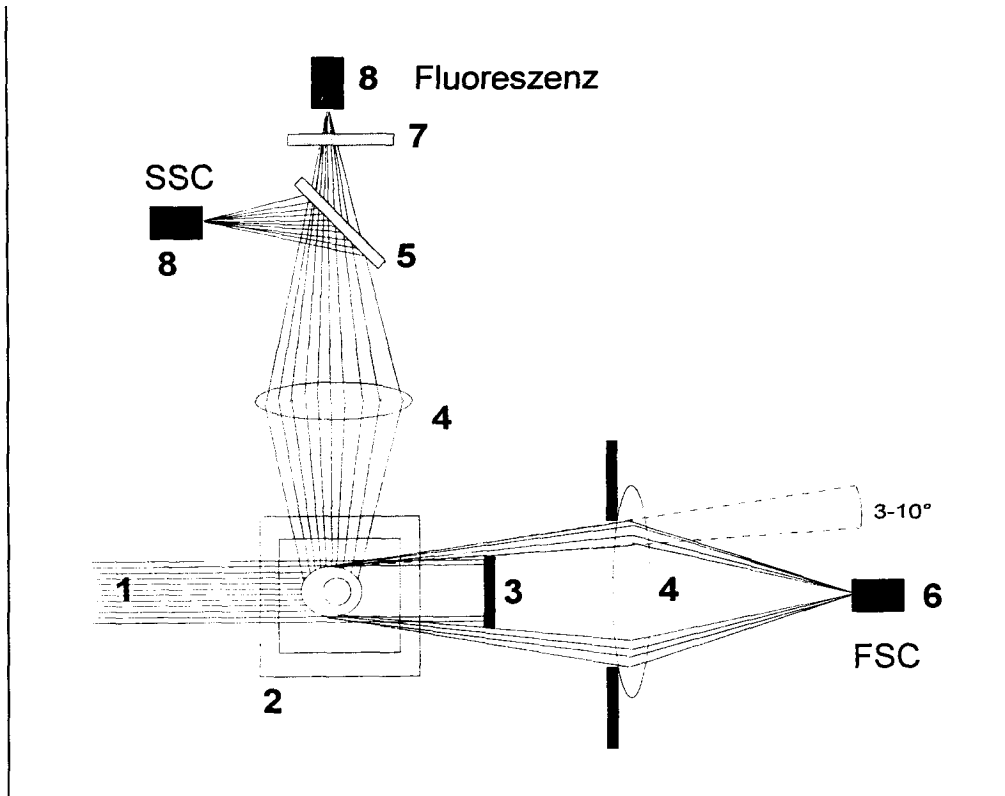


Abb. 4: Anordnung der optischen Elemente zur Messung von Fluoreszenz und Streulicht. (1=Laserstrahl, 2=Quarzglasküvette, 3=Blockerstreifen, 4=Sammellinse, 5=Teilerspiegel, 6=Photodiode, 7=Lichtfilter, 8=Photomultiplier.)

aus: Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Schmitz Rothe, Schattauer Verlag, 1994 Seite 16 [32]

2.4.2 Messung der Zellsuspensionen

Die von uns gemessenen Proben waren mit FITC bzw. CY3 gelabelt worden. Beide sind mit der gleichen Wellenlänge anregbar (488 nm), geben die Energie jedoch in unterschiedlichen Farbbereichen ab. (Fluoreszenz 1 530-560 nm bzw. Fluoreszenz 3 590-670 nm, im folgenden FL 1 und FL 3). Mit Hilfe von Filtern wurden die verschiedenen Fluoreszenzlichtintensitäten dann getrennt.

Bei der Messung verwendeten wir für das Facscan die folgenden Einstellungen :

	FSC	SSC	FL 1	FL 2	FL 3
Detektor	E00	300	627	516	706
Amplifier Gain	1,00	1,00	LOG	LOG	LOG
Data Mode	LINEAR	LINEAR	LOG	LOG	LOG

Es wurden nun je Probe mindestens 2000 events gemessen, wobei jeweils eine Positivprobe und eine Kontrollprobe als Vergleichsstandard gemessen wurden. Die Kontrollproben wurden nicht mit den Primärantikörpern p486/12 und CD 45 versetzt, sondern mit entsprechender Menge PBA (siehe auch 2.2.2.). Auch mit den fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern wurden nur die Positivproben versetzt (siehe auch 2.2.3.).

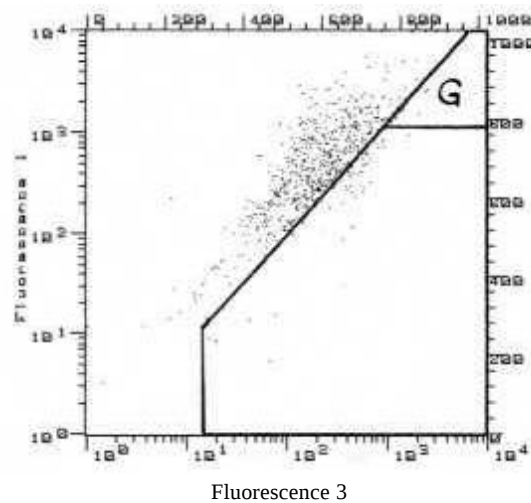
2.4.3 Auswertung und Analyse der Messungen

Die gespeicherten Daten konnten nun jederzeit in einer korrelierenden Zweipunktparameterdarstellung (dot plots) für jede Parameterkombination dargestellt und analysiert werden. Für unsere Belange war hierbei insbesondere die Darstellung der Fluoreszenz 1 gegen die Fluoreszenz 3 sowie Forward Scatter gegen Side Scatter von Interesse. In der unten zu sehenden Matrix (siehe Abb. 2.4.4) stellt jeder Punkt für eine bestimmte Zelle deren Fluoreszenz 3 (486p-AK) und Fluoreszenz 1 (CD 45-AK) dar.

2.4.4 Auswertung der dot-plots

Die Auswertung der dot-plots erfolgte nach der von G. Steinfurth entwickelten Methode [34], die aber wie nachfolgend erläutert von uns leicht modifiziert wurde. Analog zu G. Steinfurth haben wir zunächst bei Proben mit viel Debris ein Live-Gate gesetzt, um die Menge der Zelltrümmer und damit deren Einfluss zu minimieren. Denn je mehr Zelltrümmer mitgemessen werden, desto geringer wird die Prozentzahl der als positiv erfassten Zellen im Vergleich zur gesamt erfassten Zellmenge. Dann wurde in die dot-plots der Kontrollproben ein Gate gesetzt, das den Bereich umfasst, in dem in der Positivprobe die p486-positiven Zellen erwartet wurden. Dieser Bereich wurde im Vergleich zu G. Steinfurth um das Stück G erweitert (siehe Abb.).

Abb. 2.4.4



Dazu gab folgender Versuch Anlass. Wir haben zunächst eine Probe wie oben beschrieben aufbereitet, gemessen und dabei das Gate von der G. Steinfurth Methode um den Bereich G erweitert. Anschließend haben wir die gleiche Zellzahl derselben Probe mit jeweils 10000, 20000, 50000, 70000 Leukozyten (aus Buffycoats isoliert) versetzt und aufbereitet. Diese Proben wurden mit demselben Gate gemessen, das bei der Probe ohne Leukozytenzusatz genutzt wurde. Dabei zeigte sich, dass die Menge der im Gate befindlichen Zellen prozentual zur zunehmenden Menge der Gesamtzellen abnahm. Die Anzahl der im Gate befindlichen Zellen blieb also gleich, unabhängig von der Menge der zugesetzten Leukozyten. Daher ist ersichtlich, dass in dem von uns erweiterten Teil (G) des Gates keine Leukozyten sondern positiv- Zellen gemessen werden. Deshalb wurde dieser Bereich in unser Messgate aufgenommen.

Die Grenze inwieweit das Gate an die Punktwolke der negativen Zellen in der Kontrollprobe angelegt wurde, haben wir von G. Steinfurth übernommen [34]. Dieser testete für einen Bereich von 1-5 % aller Zellen der Negativprobe als „falsch Positive“ das zugehörige Ergebnis in der Positivprobe. Dabei stellte sich heraus, dass bei der 1 % Grenze wenig falsch Positive in der Positivprobe gemessen wurden, aber dafür mehr falsch Negative. Mehr falsch Positive ließ die 5% Grenze zu, lässt aber die Zahl der falsch Negativen niedrig [34]. Da es für unsere Untersuchungen entscheidender ist, die Zahl der falsch Negativen niedrig zu halten, dafür eher die Zahl der falsch Positiven etwas höher in Kauf zu nehmen, wählten wir ebenfalls die 5 % Grenze.

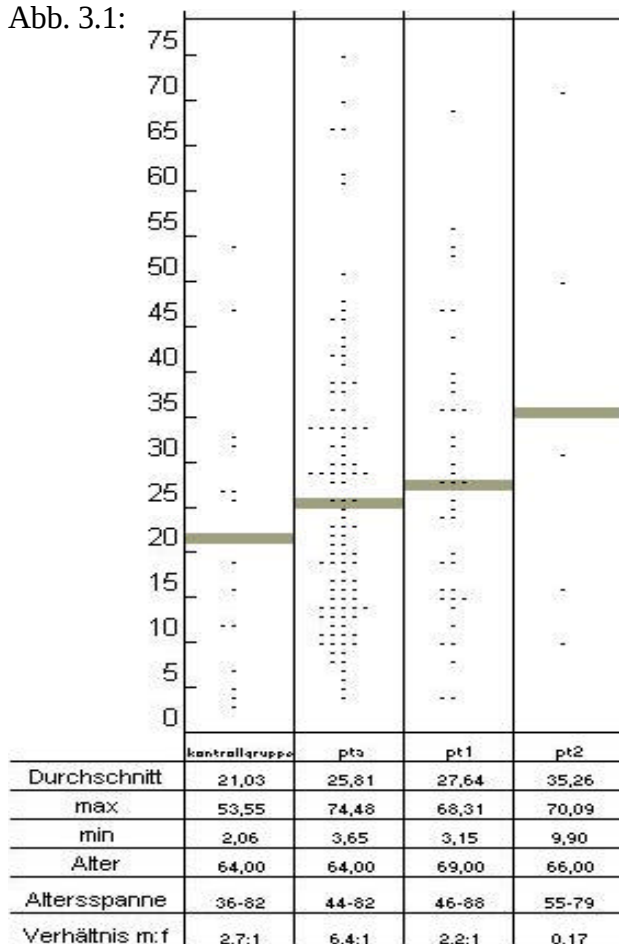
3 Ergebnisse

In den folgenden Abbildungen wird dargestellt, inwieweit der Messparameter (%AK positive Zellen) mit den Charakteristika der Tumoren wie lokale Ausdehnung, Differenzierungsgrad oder Messzeitpunkt im Krankheitsverlauf korreliert. Dabei sind in der jeweils ersten Spalte der Abbildungen die Werte der 15 Patienten der Kontrollgruppe dargestellt. Die grauen Balken geben jeweils den Mittelwert an.

3.1

Die Abbildung zeigt zunächst einen Vergleich der flusszytometrischen Ergebnisse der Kontrollgruppe zu den Ergebnissen aller Patienten mit einem Tumor. Als Kontrollgruppe dienten Patienten, die wegen Prostatakarzinom, Blasenstein, Blasenpapillom oder Cystitis in Behandlung waren. Die Aufschlüsselung erfolgt nach der lokalen Ausdehnung des Tumors (in der internationalen Einteilung von Krebserkrankung in das TNM-System mit T gekennzeichnet). Der Differenzierungsgrad wird hierbei vorerst nicht mit einbezogen.

Abb. 3.1:

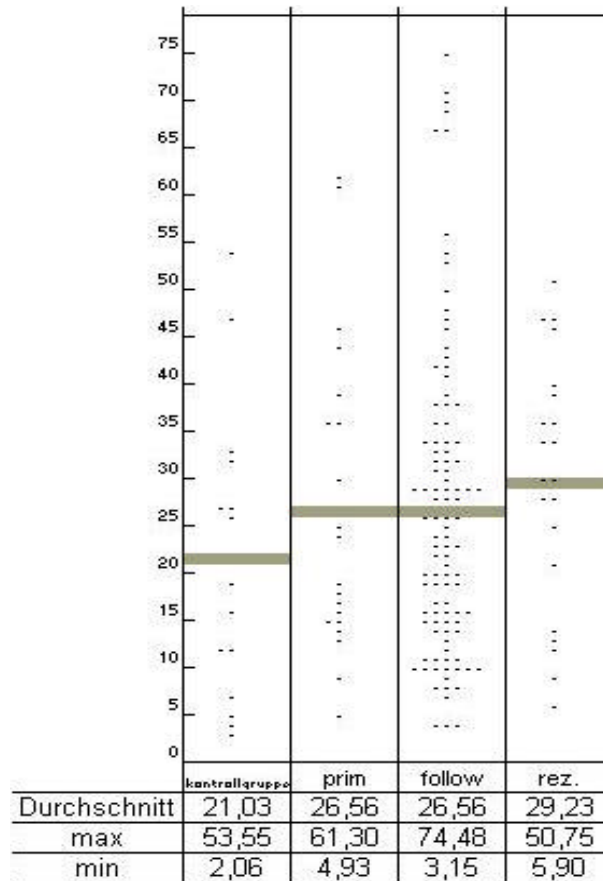


In der zweiten Spalte „pta“ sind die Werte der 100 Patienten mit einem papillären noninvasiven Karzinom dargestellt, in der dritten „pt1“ die Werte der 39 Patienten mit einem Tumor, der in die Basalmembran invasiert ist. Die vierte Spalte „pt2“ zeigt die Werte der 5 Patienten mit einem Tumor, der in die oberflächliche Muskulatur infiltriert hat.

3.2

Die Abbildung zeigt einen Vergleich der flusszytometrischen Messergebnisse in Abhängigkeit von dem Messzeitpunkt je nach dem ob dieser primär (also zum Zeitpunkt der Diagnose), im follow-up oder zum Zeitpunkt des Rezidives lag, unabhängig von der lokalen Ausdehnung des Tumors.

Abb. 3.2:

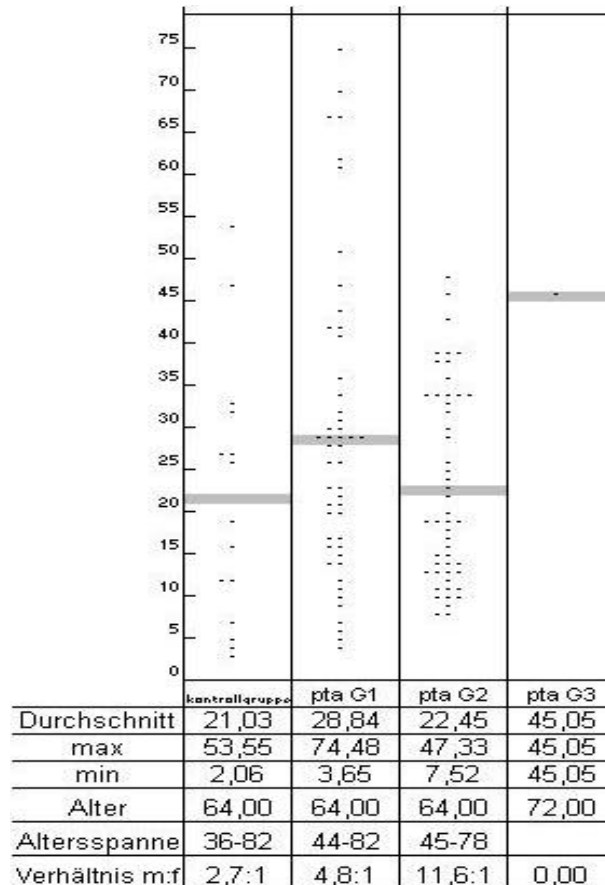


In der zweiten Spalte „prim.“ sind die Ergebnisse der 20 Messungen dargestellt, die primär erfolgten. Die dritten Spalte „follow“ zeigt die Werte der 102 Messungen im follow-up und die vierten Spalte „rez.“ stellt die 21 Messergebnisse nach Rezidiv-auftreten dar.

3.3

Die nächste Abbildung beinhaltet die Messergebnisse der Patienten mit papillärem non-invasivem Karzinom, aufgeschlüsselt nach der Differenzierung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Abb. 3.3:

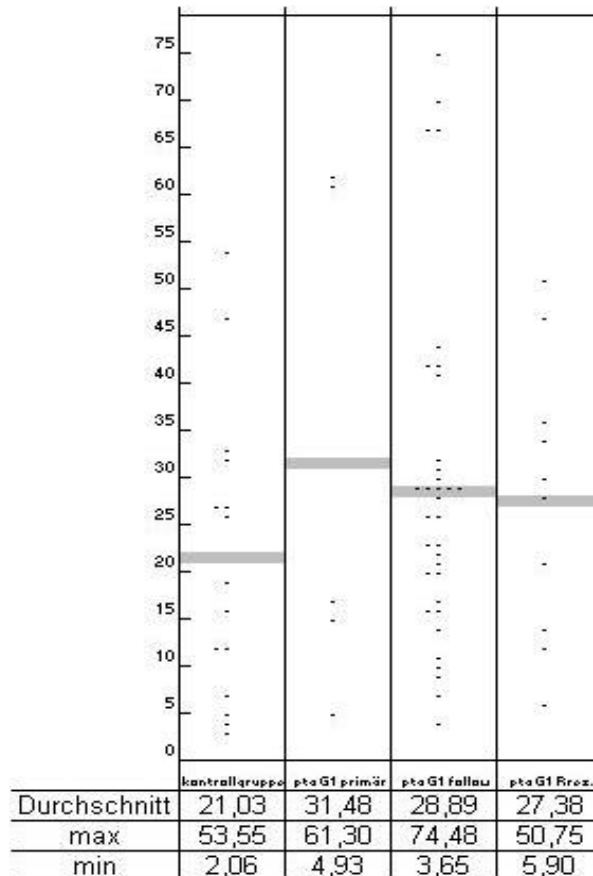


In der zweiten Spalte „pta G1“ sind die Werte der 50 Patienten mit einem papillären noninvasiven Karzinom mit einem hohen Grad der Differenzierung dargestellt. Die dritten Spalte „pta G2“ zeigt die Werte der 50 Patienten mit einem papillären noninvasiven Karzinom mit mittlerem Grad der Differenzierung. In der vierten Spalte „pta G3“ ist der Wert des einen Patienten mit einem papillären noninvasiven Karzinom mit geringem Grad der Differenzierung dargestellt. Aufgrund dieses einzelnen Wertes ist der Mittelwert ohne Bedeutung.

3.4

Die folgende Abbildung vergleicht die Kontrollgruppe mit den Werten der Patienten mit einem noninvasiven papillären Tumor mit hohem Grad der Differenzierung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung.

Abb.3.4:

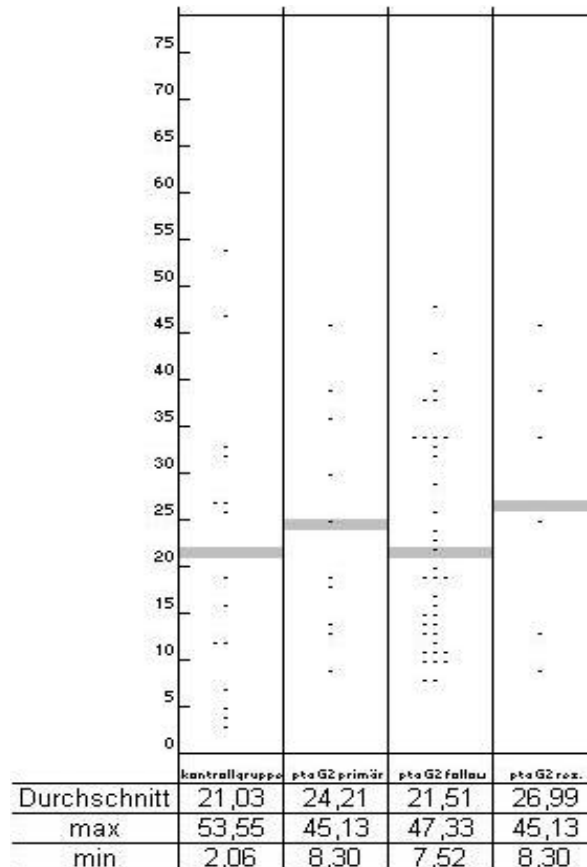


In der zweiten Spalte „pta G1 primär“ sind die 5 Werte der primären Messung der Patienten mit einem hoch differenzierten noninvasiven papillären Karzinom. Die dritte Spalte „pta G1 follow“ zeigt die 35 Werte der Patienten mit hoch differenzierten noninvasiven papillären Karzinom, die im follow-up gemessen wurden. In der vierten Spalte „pta G1 rez.“ sind die 10 Werte zu sehen, die nach Auftreten eines Rezidives bei Patienten mit einem noninvasiven papillären Karzinom mit hohem Differenzierungsgrad gemessen wurde.

3.5

Die Abbildung zeigt die Werte der Patienten der Kontrollgruppe verglichen mit den Werten der Patienten mit einem noninvasiven papillären Tumor mit mittlerem Grad der Differenzierung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung.

Abb. 3.5:



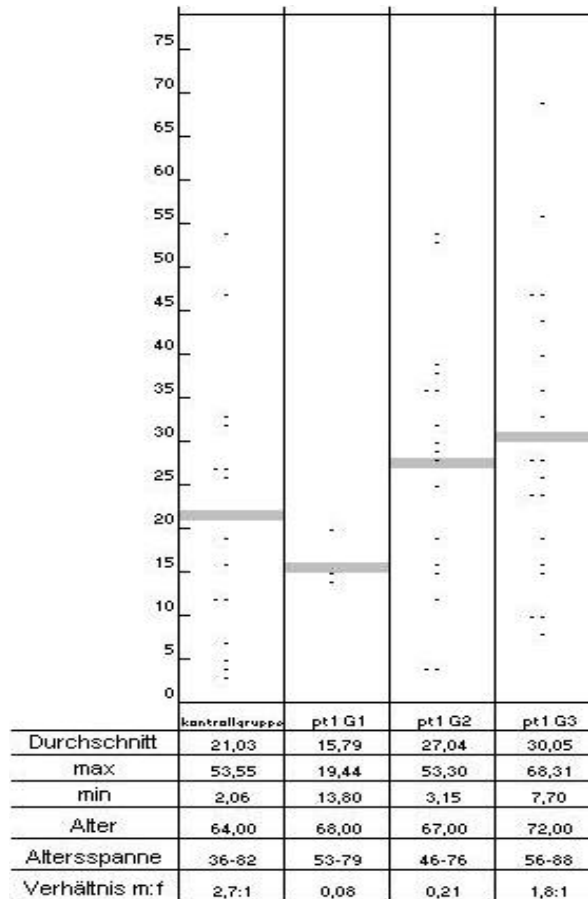
Der zweite Spalte „pta G2 primär“ zeigt die 10 Werte der primären Messung der Patienten mit einem mittel differenzierten noninvasiven papillären Karzinom. In der dritten Spalte „pta G2 follow“ sind die 37 Werte der Patienten mit mittel differenziertem noninvasivem papillärem Karzinom dargestellt, die im follow-up gemessen wurden.

Die 6 Werte, die nach Auftreten eines Rezidives bei Patienten mit einem noninvasiven papillären Karzinom mit mittlerem Differenzierungsgrad gemessen wurden, sind in der vierten Spalte „pta G2 rez.“ dargestellt.

3.6

Die nächste Abbildung beinhaltet die Messergebnisse der Patienten mit einem Karzinom, dass in die Lamina propria, in subepitheliales Bindegewebe ausgedehnt ist (pt1), aufgeschlüsselt nach der Differenzierung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Abb. 3.6:

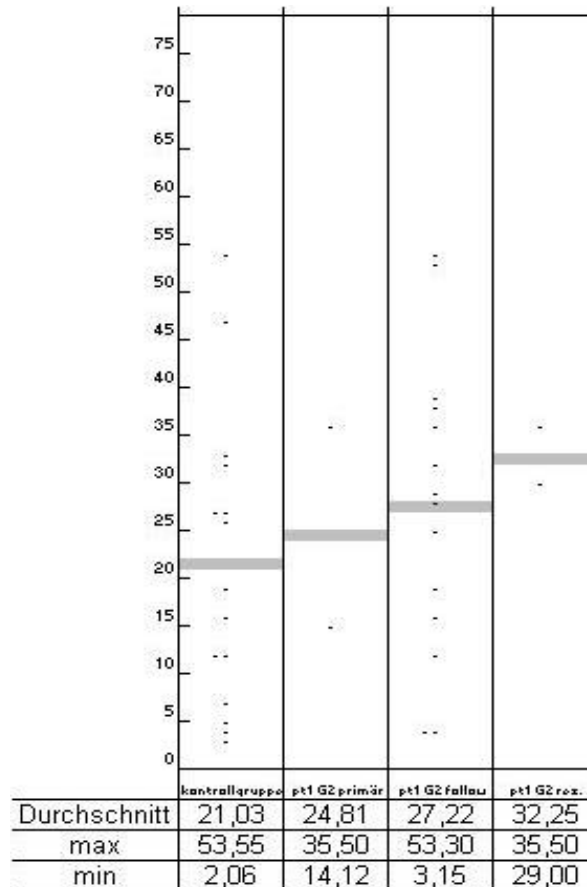


In der zweiten Spalte „pt1 G1“ sind die Werte der 3 Patienten mit einem Karzinom, welches in die Basalmembran invasiert ist, mit einem hohen Grad der Differenzierung dargestellt. Die dritten Spalte „pt1 G2“ zeigt die Werte der 17 Patienten mit einem über die Lamina Propria in die Submucosa ausgedehnten Karzinom mit mittlerem Grad der Differenzierung. Der vierten Spalte „pt1 G3“ sind die Werte der 19 Patienten mit einem in die Lamina Propria ausgedehnten Karzinom mit geringem Grad der Differenzierung zu entnehmen.

3.7

In der nächsten Abbildung sind die Werte der Kontrollgruppenpatienten mit den Werten der Patienten mit einem in die Lamina Propria ausgedehnten Tumor mit mittlerem Grad der Differenzierung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung verglichen worden.

Abb. 3.7:

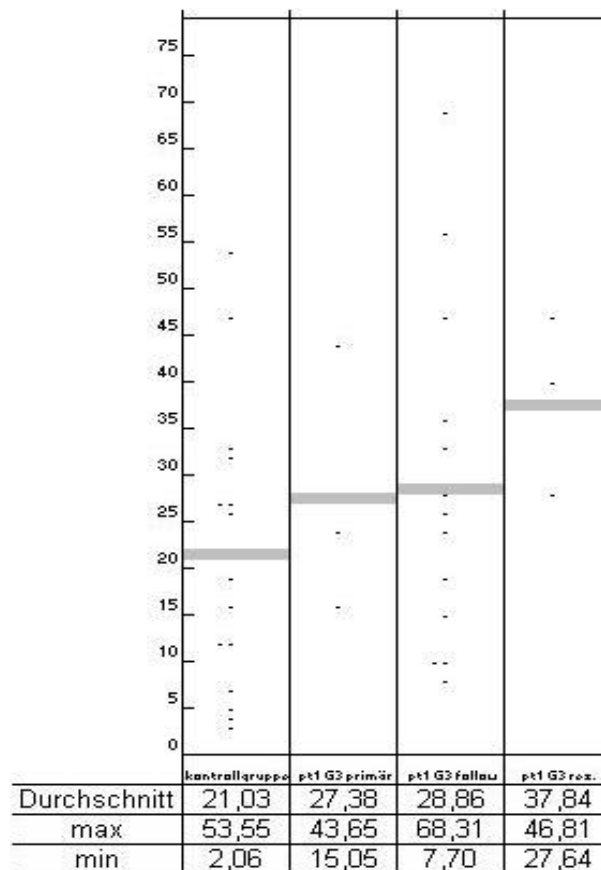


In der zweiten Spalte „pt1 G2 primär“ sind die 2 Werte der primären Messung der Patienten mit einem mittel differenzierten bis in die Lamina Propria reichendem Karzinom dargestellt. Die dritten Spalte „pt1 G2 follow“ enthält die 14 Werte der Patienten mit mittel differenziertem ins subepitheliale Bindegewebe reichendem Karzinom, die im follow-up gemessen wurden. In der vierten Spalte „pt1 G2 rez.“ sind die 2 Werte zu sehen, die nach Auftreten eines Rezidives bei Patienten mit einem die Basalmembran invasierenden Karzinom mit mittlerem Differenzierungsgrad gemessen wurden.

3.8

Die weitere Abbildung stellt die Werte der Patienten der Kontrollgruppe verglichen mit den Werten der Patienten mit einem in die Lamina Propria und das subepitheliale Bindegewebe ausgedehnten Tumor mit geringem Grad der Differenzierung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung dar.

Abb. 3.8:

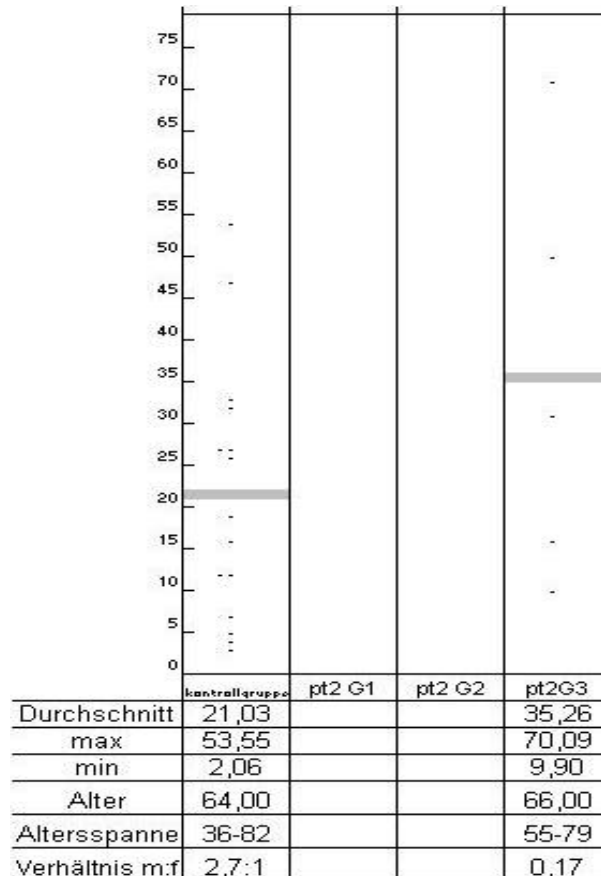


In der zweiten Spalte „pt1 G3 primär“ sind die 3 Werte der primären Messung der Patienten mit einem gering differenzierten, in die Lamina Propria reichenden Karzinom abzulesen. Die dritten Spalte „pt1 G3 follow“ enthält die 13 Werte der Patienten mit gering differenziertem, bis in die Submucosa reichendem Karzinom, die im follow-up gemessen wurden. In der vierten Spalte „pt1 G3 rez.“ sind die 3 Werte dargestellt, die nach Auftreten eines Rezidives bei Patienten mit einem die Basalmembran durchbrechenden Karzinom mit geringem Differenzierungsgrad gemessen wurden.

3.9

In der folgenden Abbildung ist die Kontrollgruppe mit den Werten der Patienten mit einem Tumor, der in die oberflächliche Muskulatur infiltriert hat und einen geringen Grad der Differenzierung aufweist, verglichen worden.

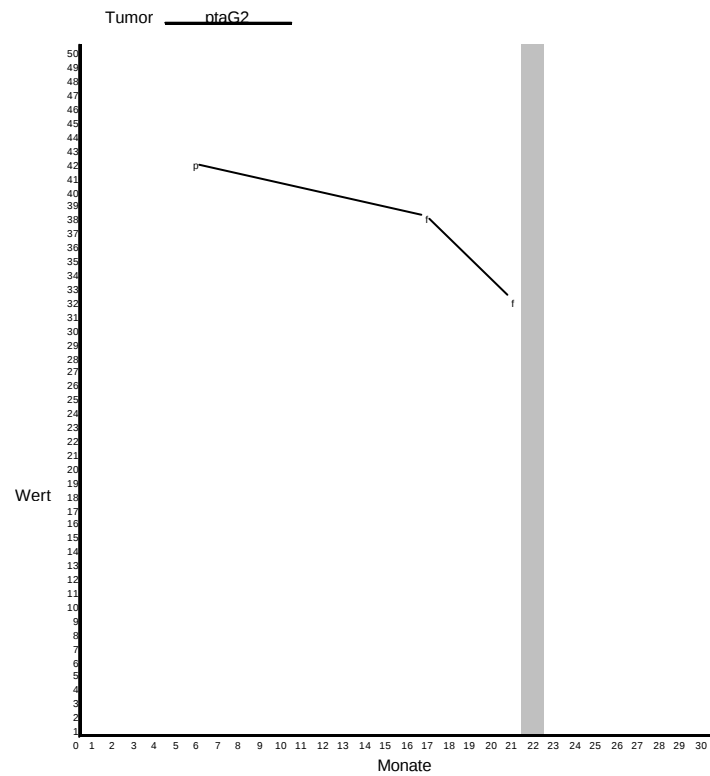
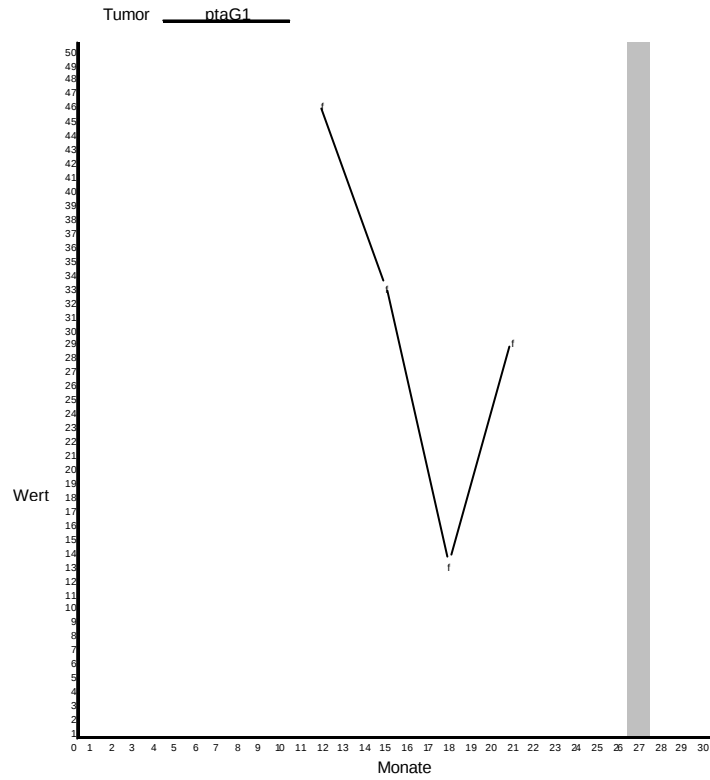
Abb.3.9:

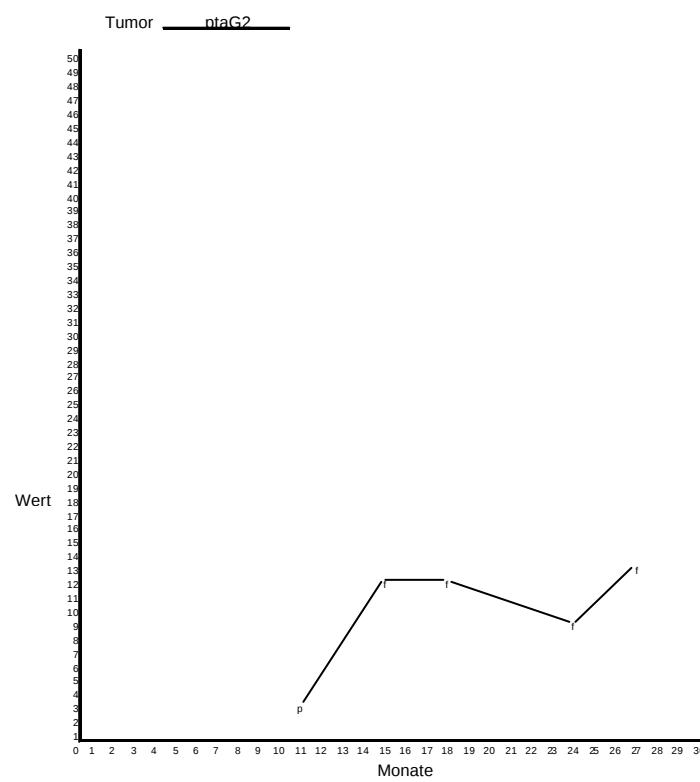
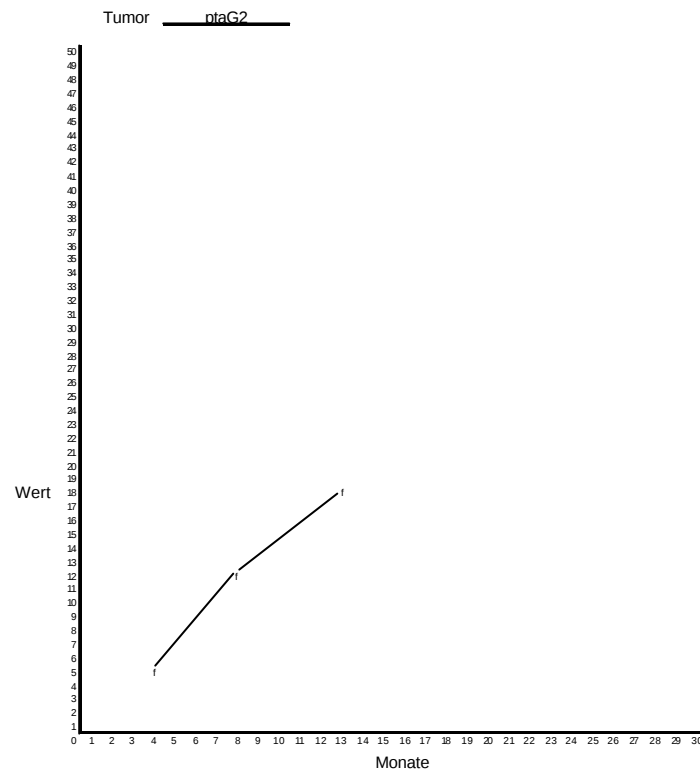


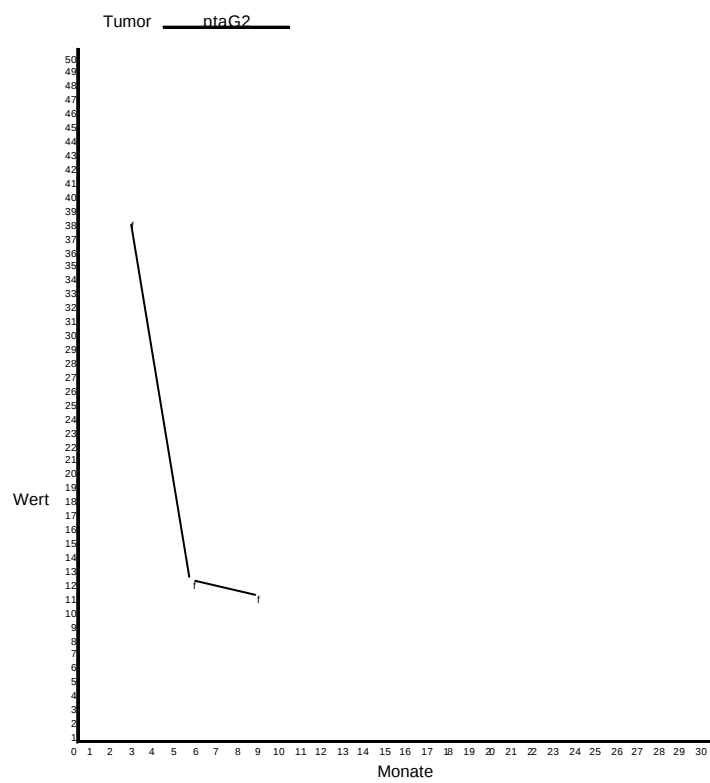
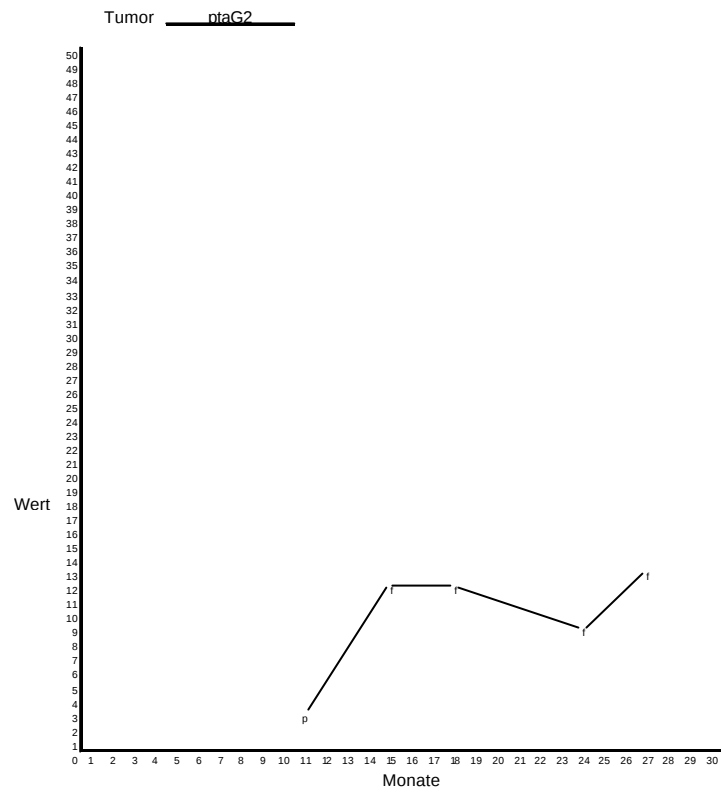
Die Spalte zwei „pt2 G1“ und drei „pt2 G2“ bleiben aufgrund nicht vorhandener Patienten mit einem in die oberflächliche Muskulatur infiltrierenden Karzinom hohen und mittleren Differenzierungsgrades ohne Werte. In der vierten Spalte „pt2 G3“ sind die Werte der 5 Patienten mit einem in die oberflächliche Muskulatur infiltrierenden Karzinom mit geringem Differenzierungsgrad dargestellt.

In den folgenden sechs Abbildungen sind die Verlaufskurven einzelner Patienten dargestellt. Die Buchstaben P und f markieren Zeitpunkt (dargestellt auf der Abszisse die Monate vom Beginn bis Ende unserer Untersuchungen) und den entsprechenden Wert (dargestellt auf der Ordinate in % AK positive Zellen). „P“ steht dabei für primäre Mes-

sung, „f“ für follow-up. Der graue Balken kennzeichnet den Zeitpunkt des Rezidiv-auftretens. Bei den Abbildungen ohne grauen Balken waren die Patienten bis zum Abschluss unserer Untersuchungen rezidivfrei.







4 Diskussion

4.1 Material und Methodik

4.1.1 Zellausbeute bei der Blasenspülung

Bei der von uns verwendeten Methode der flowzytometrischen Auswertung der Probe ist die Zahl der gemessenen Zellen von entscheidender Bedeutung. Denn nur bei genügender Zellmenge und annähernd gleicher Zellzahl zur Auswertung ist ein Vergleich der Ergebnisse möglich.

Es stellte sich dabei heraus, dass die Zellzahl sehr stark abhängig ist von der korrekten Entnahme der Blasenflüssigkeiten. Während unserer Versuchsreihe begann die Zahl der Zellen in den Proben stark abzunehmen, so dass nach der unter 2.1.2. beschriebenen Methode der Zellgewinnung bei der Messung keine 10^5 Zellen entsprechende Menge an Zellsuspension vorhanden war. Die entsprechenden Proben mussten aufgrund mangelnder Zellzahl verworfen werden. Als häufiger Proben aus diesem Grund für unsere Auswertung nicht mehr genutzt werden konnten, baten wir in einem Rundschreiben noch einmal um die korrekte Entnahme der Blasenspülflüssigkeit insbesondere um ein mehrmaliges Spülen (10-mal). In den anschließend gelieferten Proben war die Zellzahl um ein Mehrfaches erhöht, so dass die Proben wieder zur Auswertung genutzt werden konnten.

4.1.2 Hämorrhagische Proben

Ein weiteres Problem bezüglich der Zellzahl stellten insbesondere die stark hämorrhagischen Spülungen dar. Trotz Vorbehandlung mit NH_4CL zur Ausfällung stellte sich später bei der Auswertung der dot-plots heraus, dass ein großer Teil der Zellen Debris und keine relevanten Zellen waren. Der Ausschluss von Debris mittels Gate minimierte dieses Problem. Dies hatte wiederum den Nachteil, dass die verbleibende Menge an Zellen häufig gering war. Einige Proben hatten eine so geringe Zellzahl, dass eine Auswertung nicht möglich war. Bei ausreichender Zellzahl war diese im Vergleich zu nicht hämorrhagischen Proben jedoch oft um soviel geringer, dass ein objektiv vergleichbarer Wert nicht zu ermitteln war. Bei gleicher Zahl positiver Zellen in zwei Proben ist der gemessene Prozentsatz höher in der Probe mit der geringeren

Ausgangszahl an Zellen. Wird also bei einer Probe mit festgelegter Zellzahl eine bestimmte „Zellart“ (in unserem Fall Debris) entfernt oder zahlenmäßig minimiert, wird auf diese Weise indirekt der Prozentsatz der anderen Zellen in dieser Probe erhöht. Die Prozentsätze dieser Probe sind streng genommen nicht mehr objektiv mit denen der anderen vergleichbar.

4.1.3 Grenzlinienziehung

Eine geringe Fehlerquelle liegt in der Tatsache, dass eine hundertprozentige Trennung von Antikörperpositiven- bzw. negativen Zellen mit der Grenzlinienziehung im dot-plot im Übergangsbereich nicht realisierbar ist, aber durch die 5% Grenze soweit wie möglich minimiert wird (siehe 2.4.4).

4.1.4 Verlaufskurven

Die o.g. Probleme insbesondere der Zellzahl führte zum Verwerfen einiger Proben. Daher erhielten wir von den einzelnen Patienten zu wenig kontinuierliche Spülungen mit messbaren Ergebnissen. Deshalb waren bei der Auswertung der Ergebnisse häufig keine deutlichen Verlaufskurven der einzelnen Patienten erstellbar, aus denen man weitere Schlüsse hätte ziehen können.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Patientenkollektiv

Das von uns ausgewertete Patientenkollektiv entspricht in der Verteilung bezogen auf die Tumorausdehnung der Normverteilung, d.h. dass zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 80 % der Tumoren pt1 oder pta sind.

In der ersten Ergebnistabelle sind die Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten der Patienten mit pta, pt1 und pt2 Tumor dargestellt. Zu erwarten wäre ein niedrigerer Durchschnittswert bei der Kontrollgruppe, ein deutlich höherer Durchschnittswert bei pta und noch etwas höhere Werte bei pt1 und pt2. Die Staffelung der Werterhöhung ist zwar vorhanden, aber der Durchschnittswert der Kontrollgruppe liegt mit 21,03 nur knapp unter dem der Patienten mit pta-Tumor bei 25,81. Die Spanne der

Werte der Patienten mit einem Tumor ist bis auf wenige Werte deckungsgleich mit der Kontrollgruppe. Wenn man den Durchschnittswert der Kontrollgruppe als pos-/neg-Grenze setzt, würde dies bedeuten, dass bei pta-Tumoren 54 richtig positiv (=54%) und 46 falsch negativ (=46%) sind. Bei den pt1 Tumorpatienten sind demnach 24 richtig positiv (=61,5%) und 15 falsch negativ (38,5%). Bei den pt2 Tumorpatienten sind 3 richtig positiv (=60%) und zwei falsch negativ (=40%). Die Rate der falsch negativen schwankt zwischen 38,5-46% und ist damit in der Sensivität gering.

In der nächsten Ergebnistabelle sind die Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Primär-, follow-up- bzw. Rezidivwerten unabhängig von der Ausdehnung des Tumors dargestellt. Die erwarteten Ergebnisse sähen wie folgt aus: Wert der Kontrollgruppe niedrig, Durchschnittswert der Primärwerte deutlich höher, Durchschnittswert der follow-ups ähnlich niedrig den Werten der Kontrollgruppe, Durchschnittswert der Rezidiv-Patienten wieder höher, ansteigend bis zu den Primärwerten und darüber hinaus. Die tatsächlichen Ergebnisse konnten diese Erwartung nicht erfüllen. Die Werte der primären Messung waren im Durchschnitt nur unwesentlich höher als die der Kontrollgruppe. Die durchschnittlichen Ergebnisse der follow-up Messungen waren identisch mit denen der primären Messung und wiesen eine immense Streuung auf. Demnach war im Durchschnitt nach erfolgter Operation keine deutliche Senkung der positiven Zellen zu erkennen. Die Werte der Messungen nach Rezidivaufreten waren gegenüber den follow-up Messungen nur unwesentlich erhöht.

4.2.2 Aufschlüsselung nach Untergruppen

Da aufgrund dieser Ergebnisse keine Korrelation zwischen klinischem Verlauf und Messergebnis zu erkennen war, haben wir die Ergebnisse getrennt nach Tumorgrad und Differenzierung aufgeschlüsselt und ausgewertet, um eventuell bei einer Untergruppe eine Korrelation zu entdecken.

Zunächst haben wir nur die Patienten mit papillärem noninvasiven Karzinom nach Differenzierungsgrad aufgeteilt und mit den Werten der Kontrollgruppe verglichen. Die Werte der Patienten mit pta G1 Tumor lagen im Durchschnitt höher als die der Patienten mit pta G2. Aufgrund eines einzelnen Messwertes eines Patienten mit pta G3 ist darüber keine vergleichende Aussage möglich. Eine weitere Differenzierung der Patienten mit einem pta G1 Tumor nach Messzeitpunkt (primär, follow-up, zum

Rezidivaufreten) ergab, dass die Primärwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe erwartungsgemäß höher waren, während des follow-up's aber im Durchschnitt nur wenig absanken und zum Zeitpunkt des Rezidivauftritts nicht anstiegen, sondern sogar noch gering abfielen.

Die gleiche Differenzierung haben wir bei den pta G2 Tumorpateinten durchgeführt. Auch hierbei war nur ein gering erhöhter Durchschnittswert im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Der durchschnittliche follow-up Wert war so niedrig wie der der Kontrollgruppe und stieg bei den Rezidivmessungen wieder stärker an. Bei diesen Werten ist eine Korrelation zum klinischen Verlauf zu beobachten. Allerdings sind die Spannen der einzelnen Werte sehr groß und die Unterschiede zwischen den Durchschnittswerten sehr gering.

Ebenso wie die Werte der pta-Tumorpateinten haben wir die Werte der pt1 Tumorpateinten gesondert aufgeschlüsselt betrachtet. Dabei fiel bei der Aufschlüsselung nach Differenzierungsgrad auf, dass die Durchschnittswerte der pt1 G1 Tumorpateinten noch unter denen der Kontrollpateinten lagen. Es war allerdings ein Anstieg der Durchschnittswerte bei abnehmendem Differenzierungsgrad zu erkennen. Bei weiterer Aufteilung der pt1 G2 Werte nach Primär-, follow-up- und Rezidivmessung war jeweils ein Anstieg der Durchschnittswerte zu verzeichnen. Bei den pt1 G3 Werten war dies ebenso der Fall. Hierbei war keine Korrelation im Vergleich zum klinischen Verlauf zu erkennen, denn die im follow-up gemessenen Werte waren höher als die der Kontrollgruppe und lagen sogar über den primär gemessenen Werten.

Bei der Gruppe der pt2 Tumorpateinten lagen nur wenige Werte vor. Diese Tumore waren alle gering differenziert (pt2 G3) und waren im Vergleich zur Kontrollgruppe stark erhöht.

Anhand dieser Ergebnisse waren auch nach verschiedenen Aufschlüsselungen aufgrund der durchschnittlichen Werte der Untergruppen keine deutliche Korrelation zum klinischen Verlauf zu erkennen. Daher haben wir die Verlaufskurven einzelner Pateinten gesondert betrachtet. Um unsere Hypothese zu bestätigen, müsste der Primärwert sehr hoch sein, der follow-up Wert wesentlich niedriger; alle weiteren follow-up Werte sollten ähnlich niedrig sein und nur bei Pateinten, die ein Rezidiv erleiden, kurz vorher wieder ansteigen.

In der ersten Abbildung sind die Werte der follow-up's stark abfallend, steigen aber kurz vor Auftreten des Rezidives wieder an. In der zweiten Abbildung ist der erste follow-up Wert nur etwas niedriger als der Primärwert, es kommt dann zu einem leichten Abfall des follow-up Wertes und kurz darauf zur Rezidivbildung. Dies steht im völligen Gegensatz zu unserer Erwartung.

Die weiteren Abbildungen (drei bis sechs) zeigen Verlaufskurven von Tumorpatienten ohne Rezidiv. Dabei sind die starken Schwankungen der follow-up Werte auffällig. In Abbildung vier und fünf sind die Werte die Primärmessung vorhanden und eingetragen. In beiden Fällen liegen diese deutlich niedriger als die folgenden follow-up Werte und widerlegen damit unsere Annahme eines Abfalls der Ak positiven Zellen. In der Abbildung drei sind die follow-up Werte kontinuierlich stark ansteigend, ohne dass es zum Rezidivauftreten kommt.

Diesen Ergebnissen zufolge ist auch bei der Betrachtung der Verlaufskurven einzelner Patienten keine Korrelation zwischen flusszytometrischer Messung und klinischem Verlauf zu erkennen. Diese Methode ist demnach als Prognoseparameter nicht geeignet.

4.2.3 Andere Prognoseparameter

Da der untersuchte Antikörper keine Vorhersage für die Prognose lieferte, haben wir in Vorversuchen einen weiteren Antikörper URO 5 getestet. Die Ergebnisse waren wenig vielversprechend und deshalb wurden die Untersuchungen abgebrochen.

Eine Vielzahl von möglichen Prognoseparametern wird derzeit von anderen Arbeitsgruppen untersucht.

Zwei neue, noch wenig angewandte, aber ausbaufähige Untersuchungsverfahren lassen laut Dr. Mallet auf eine höhere Sensivität hoffen (MT online 17.08.99 Dr. Mallet). Es handelt sich um Quanticyt (Analyse von Zellkern und DNA mit Spezialfärbung) und Immunocyt (immunfluoreszenz-zytologische Untersuchung).

Einige weitere Tests zeigen bisher Ergebnisse mit einem hohen prognostischen Wert. Es sind dies die Suche im Urin nach dem Bladder-Tumor-Antigen (BTA-Test), Urinary Nuclear Matrix Progin (NMP-22-Test), nach Fibrinospaltprodukten (PDF-Test) und Cytokeratin (Cyfra21-1). (MT online 17.08.99 Dr. Mallet)

In Untersuchungen der Universität Tübingen wurde die Bedeutung des Nuklear Matrix Proteins 22 (NMP 22) für die Detektion und Verlaufskontrolle des Blasenkarzinoms

getestet (Lahme, 1999). Bei 164 Patienten wurde im Rahmen einer prospektiven Studie der NMP 22 Test im Vergleich zur Urinzytologie evaluiert. Von den untersuchten Patienten hatten 40 ein Blasenkarzinom, 44 waren in der Verlaufskontrolle des Blasenkarzinoms, 7 Patienten hatten einen Harnwegsinfekt, 12 Harnsteinpatienten und 61 gesunde Probanden als Kontrollkollektiv. Bei unterschiedlichen Cut-off-Werten (von 7-12 U/ml) wurde Sensivität und Spezifität bestimmt. Die Sensivität betrug 68,2-51,2 %, die Spezifität 76,7-93,3 %. Bei einem Cut-off von 10 U/ml ergab sich bei guter Spezifität von 93,3% eine ausreichende Sensivität von 61%. Von den invasiv wachsenden Tumoren wurden 90% erkannt (mit Urinzytologie 70%), bei oberflächlichen Tumoren war die Sensivität mit 46,7 % ebenfalls höher als bei der Urinzytologie mit 36,7 %. Bei Patienten mit Urolithiasis und Harninfektion betrug die Spezifität 50 % und ist damit der Urinzytologie unterlegen, da bei dieser keine falsch positiven Befunde auftraten. Daraus folgte Dr. Lahme, dass der NMP 22 Test eine Methode zur Erkennung und Verlaufskontrolle des Blasenkarzinoms darstellt, die eine, gemessen an der Urinzytologie, ausreichende Spezifität und Sensivität aufweist, aber zytoskopische Kontrollen nicht ersetzen kann (Lahme, 1999).

In einer Studie zum Vergleich von BTA-Test, NMP 22 und VUC (voided urinary cytology) in Bezug auf Erkennung des Primärtumors und Rezidiven wurden die Tests an Urinproben von 147 Patienten durchgeführt, von denen 85 keinen Blasentumor in der Vergangenheit hatten und 62 wegen eines oberflächlichen Karzinoms beobachtet wurden (Giannopoulos et al., 2000). Eine Gruppe von gesunden altersmäßig ähnlichen Patienten wurde ebenfalls einbezogen. Histologisch wurde bei 99 Patienten ein Karzinom bestätigt, 62 davon waren Primärtumore und 37 Rezidive. Es zeigte sich, dass sowohl BTA-Test als auch NMP 22 besser zur Tumorerkennung geeignet sind als VUC (Sensivität von BTA 71,7 %, von NMP 22 62,6 % und von VUC 38,4 %). Dabei zeigte der BTA-Test verglichen mit dem NMP 22 Test eine höhere Sensivität (71,7 % bzw. 62,6 %), während der NMP 22 Test spezifischer war (73,9 % bei NMP 22 bzw. 56,5 % bei BTA). Falsch positive Ergebnisse in beiden Tests bei einem Patienten follow-up scheinen dabei mit einem zukünftig auftretenden Rezidiv zu korrelieren (Giannopoulos et al., 2000).

Ein weiterer Ansatzpunkt in der Suche nach einem Prognoseparameter ergibt sich aus der Bestimmung von p185. In einer 5-Jahres-Studie über den Prognosewert von p185

Onkoprotein wurden 81 Patienten Gewebeproben entnommen (Moreno Sierra et al., 2000). Dabei stammten zwanzig Proben von nichttumorösem Blasengewebe, die anderen einundsechzig Proben wurden Patienten mit Blasenkarzinom entnommen. Die Erhöhung von p185 wurde durch Enzym Immunoanalyse (EIA) bestimmt. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet. Dabei fanden sich erhöhte Level von p185 bei Patienten, die ein Rezidiv hatten. Auch bei den Patienten, die an Blasenkarzinom verstarben, war der p185 Level höher als bei den überlebenden Patienten, aber der Unterschied war statistisch nicht groß genug, um darauf auf ein Gesamtüberleben oder Schichtung von Tumorgrad oder Infiltration Rückschlüsse zu ziehen. Demnach wird von der durchführenden Studiengruppe eine Bestimmung von p185 Onkoprotein als sinnvoll erachtet in der Voraussage des Wiederauftretens von Tumoren (Moreno Sierra et al., 2000).

Ein weiterer Ansatzpunkt in der Rezidivfrüherkennung bietet die Kombination einiger Parameter. Dabei beschreibt Dr. med. Krause die kombinierte Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki 67, des Markers für die Tumorsuppression p53, des Nicht-metastasierungsproteins nm 23 und dem Nachweis DNA aneuploider Tumorzellen als vielversprechend (Krause, 1999). Mittels spezifischer Antikörper wurden die Tumormarker an entparafinierten Gewebeschnitten immunhistochemisch nachgewiesen. Mit DNA-Zytophotometrie wurden aneuploide Tumorzellen mit einem DNA-Gehalt $>5c(5cER)$ aus den Blasenspülflüssigkeiten bestimmt. Ki67 und p53 waren bei benignem Gewebe stets negativ und für nm23 stets positiv und aneuploide Zellen waren nicht nachweisbar. Im Vergleich zu fortgeschrittenen Karzinomen zeigte das oberflächliche Karzinom das geringste Proliferationsverhalten (Ki67), den geringsten Anteil aneuploider Zellen, aber eine am stärksten alterierte Tumorsuppression (p53) und ein erkennbares Metastasierungspotential (nm23). Zumindest für das oberflächliche Harnblasenkarzinom bietet sich laut Dr. Krause somit die Möglichkeit der Früherkennung möglicher Tumorrezidive nach transurethraler Resektion (Krause, 1999).

Als prognostischer Marker beim Harnblasenkarzinom kommen möglicherweise auch das monocyte chemoattractant protein (MCP-1) und Interleukin 8 (IL-8) in Frage. In einer Arbeit von Dr. med. Perabo wurde erstmals gezeigt (Perabo, 1999), dass Harnblasenkarzinomzellen in vitro und in vivo MCP 1 und IL 8 produzieren und dass die Urinkonzentration dieser Moleküle mit dem Tumorstadium und dem Differenzierungs-

grad des Tumors korrelieren. Inwieweit MCP 1 und IL 8 sich aufgrund dessen als relevante prognostische Marker eignen muss erst in prospektiven Studien geklärt werden (Perabo, 1999).

Ebenfalls erst in weiteren Studien nachzuweisen ist die Signifikanz von Metallothionein. Diese Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der zellulären Detoxifikation von Schwermetallionen und besitzen eine Induzierbarkeit durch viele Faktoren, insbesondere Metalle. An Zystektomiepräparaten wurde eine Immunhistologie gegen Metallothionein durchgeführt, mikroskopisch ausgewertet und statistisch berechnet hinsichtlich TNM-System, histologischem Grading, den Überlebensdaten und (sofern durchgeführt) den Chemotherapiedaten (Wülfing, 1999). Für das in der Studie von Dr. Wülfing verwendete Kollektiv zeigte dieser, dass die Expression von Metallothionein ein unabhängiger Prognosefaktor für das Harnblasenkarzinom ist (Wülfing, 1999).

All diese Prognoseparameter sind zur Zeit noch nicht ausgereift, zeigen aber zum Teil interessante Perspektiven. Ihr genauer Aussagewert bezüglich der Behandlungsstrategien lässt sich erst durch weitere Studien bestimmen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden flusszytometrischen Studie wurden aus Blasenspülungen von Blasenkarzinompatienten (die mittels intravesikaler Chemotherapie behandelt werden) Blasen-Ca Zellen zum Zeitpunkt der Diagnose und während der Verlaufskontrolle gewonnen. Diese wurden mittels Flusszytometrie mit dem Antikörper 486p 3/12 analysiert.

Dabei war beim Betrachten der durchschnittlichen Werte der Patienten zum gleichen Krankheitszeitpunkt keine Korrelation zwischen Expression des 486p Antigens und Krankheitsverlauf zu erkennen (keine Senkung der positiven Zellen nach Operation, keine Erhöhung vor Rezidivaufreten). Auch bei gesonderter Untersuchung der Verlaufskurven einzelner Patienten erwies sich die flusszytometrische Untersuchung mit dem 486p 3/12 nicht als prognostisch relevant.

Die differenzierte Ergebnisanalyse aufgeschlüsselt nach Tumorgrad und Differenzierung ließ ebenfalls keine prognostische Bedeutung erkennen.

Die flusszytometrische Analyse von Blasen-Ca Zellen mit dem Antikörper 486p 3/12 stellt somit für die Prognosebeurteilung von Blasenkarzinompatienten und Rezidivfrüherkennung keine geeignete aussagekräftige Methode dar.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Alken Peter, Walz Peter H. (Hrsg.) mit Beiträgen von P. Alken, M. Bühring, P. Fornara et al : Urologie, 2. überarbeitete Auflage, Weinheim, Chapman&Hall,1998
- 2 Althausen AF, Prout Jr GR, Daly JJ: Noninvasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ, J Urol 116:575, 1976
- 3 Altwein Jens E., Rübben Herbert (Hrsg.): Urologie, 4. Überarbeitete Auflage, Stuttgart, Enke,1993, Schriftreihe: Enke-Reihe zur AO,(Ä)
- 4 Anderstrom C, Johansson C, Nilsson S: The significance of lamina propria invasion on the prognosis of patients with bladder tumors, J Urol 124:23,1980
- 5 Barnse RW, Dick AL, Hadley HL, et al: survival following transurethral resection of bladder carcinoma, Cancer Res 37:289,1977
- 6 Block, Kriegmaier, Busch, Weiß: Therapieempfehlungen des Tumorzentrums München, 1997
- 7 Deresiewicz RL, Stone RM, Aster JC: Fatal disseminated mycobacterial infection following intravesical Bacillus Calmette-Guerin, J Urol 144:1331, 1990
- 8 Fitzpatrick JM, West AB, Butler MR et al: superficial bladder tumor (stage pTa, grades 1 and 2), The importance of recurrence pattern following initial resection, J Urol 135:920, 1986
- 9 Fradet Y, Islam N, Boucher L, et al: Polymorphic expression of a human superficial bladder tumor antigen defined by mouse monoclonal antibodies, Proc Natl Acad Sci 84: 7227, 1987

- 10 Fradet Y, laRue H, Parent-Vaugeois C, et al: Monoclonal antibody against a tumorassociated sialoglycoprotein of superficial papillary bladder tumors and cervical condyloma, Int J Cancer 46:990, 1990
- 11 Giannopoulos A., Manousaka T., Mitopoulos D, et al. Comparative evaluation of the BTastat test, NMP22, and voided urine cytology in the detection of primary and recurrent bladder tumors ,Urology 2000 Jun, 55(6): 871-5
- 12 Hartenstein, Harnblasenkarzinom, Hrsg: Huhn, Herrmann: Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen, Stuttgart, Fischer Verlag, 1995
- 13 Hautmann Richard E., Huland Hartwig: Urologie, Schriftreihe: Springer Lehrbuch, Berlin, Springer Verlag, 1997
- 14 Heney N, Ahmed S, Flanagan MJ, et al: Superficial bladder cancer: Progression and recurrence, J Urol 130:1083, 1983
- 15 Herr HW, Landone VP, Badalament RA, et al: Experience with intravesical BCG therapy of superficial bladder tumors
- 16 Hollister D, Coleman M: Hematologic effects of intravesical thiotepa therapy for bladder cancer, JAMA 244:2065,1980
- 17 Huland E, Huland H, Arndt R, et al : Urindiagnostik oberflächlicher Harnblasentumoren durch Zytologie, Immunzytologie und Flowzytometrie. Ergebnisse einer prospektiven vergleichenden Studie an 104 Patienten, Akt. Urol. 19: 13,1988
- 18 Huland H., Arndt R., Huland E. et al: Monoklonal antibody 486 p 3/12: a valuable bladder carcinoma marker for immunocytology. J Urol 137:645, 1987

- 19 Huland E., Huland H, Meier T, et al: Comparison of 15 monoclonal antibodies against tumor associated antigens of transitional cell carcinoma of the human bladder J Urol 146:1631,1991

- 20 Jakse G, Putz A, Feichtinger J: Cystectomy: the treatment of choice in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder ? Europ J Surg Oncolo 211-216, 1989

- 21 Krause F., Abstract zur Vorlesung von Krause Frens St, Dr. med., Abteilung Urologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen über tumorbiologische Untersuchungen im Hinblick auf die Rezidiverkennung oberflächlicher Blasenkarzinome anlässlich der 43. Tagung der Nordrhein westfälischen Gesellschaft der Urologier Urologie am 15-17 April 1999

- 22 Lahme S., Abstract zum Vortrag von Lahme, Sven, Dr. med., Facharzt für Urologie, Urologische Abteilung, Eberhard- KarlsUniversität Tübingen zur Bedeutung des Nuklear Matrix Proteins 22 für die Detektion und Verlaufskontrolle des Blasenkarzinoms zur 45. Tagung der Nordrhein westfälischen Gesellschaft für Urologier Urologie am 15-17 April 1999

- 23 Lamm DL: Long-term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer, Urol Clin North am 19:573, 1992

- 24 Malmstrom P, Busch C, Norlen BJ: Recurrence, progression and survival in bladder cancer; a retrospective analysis of 232 patients with less than 5 year follow up, Scand J Urol Nephrol 21:185, 1982

- 25 Merkle Walter (Hrsg.) mit Beiträgen von W. Diederichs, W. Diemer, A. Frankenschmidt, et al.: Urologie, Duale Reihe, Stuttgart, Hippokratesverlag 1997

- 26 Morales A, Eidinger D, Brucee AW: Intracavitary Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors, J Urol 116:180, 1976

- 27 Moreno Sierra J, Maestro de las Casas ML, Redondo Gonzalez E, et al., P185 oncoprotein in the prognosis of bladder carcinoma. Experience of 5 years, Arch Esp. Urol 2000 Apr;53(3): 238-44
- 28 Perabo F., Abstract zur Vorlesung von Perabo Frank G. E., Dr. med., Arzt für Urologie, Klinik für Urologie der Rheinischen Fr.-Wilhelms- Uni Bonn über „ Die Expression von Chemokinen im Urin korreliert mit Tumorstadium und Differenzierungsgrad „ anlässlich der 43. Tagung der Nordrhein westfälischen Gesellschaft für Urologie am 15.-17 April 1999
- 29 Prout GR Jr, Griffin PP, Daly JJ, et al: Carcinoma in situ of the urinary bladder with and without associated vesical neoplasms, Cancer 52: 524, 1983
- 30 Richie JP, Skinner DG, Kaufmann JJ : Radical cystectomy for carcinoma in the bladder: 16 years of experience, J. Urol. 113: 186-189,1975
- 31 Richie JP, Shipley WU, Yagoda: Cancer of the bladder, De Vita VT, Hrsg: Hellmann S, Rosenberg SA, Cancer principles and practice of oncology, JB Lippincott Philadelphia,1989
- 32 Schmitz G., Rothe G.: Durchflusszytometrie in der Zelldiagnostik, Stuttgart, New York, Schattauer Verlag, 1994
- 33 Shively Je and Todd ChW: carcinoembryogenic antigens, Sell (ed): Chemistry and Biology in Cancer Markers: Diagnostic and Developmental significance, St. Humana Press, Inc., USA, pp 295-319,1980
- 34 Steinfurth G., Dissertation in Vorbereitung, 2000
- 35 Sökeland Jürgen: Urologie, 10. überarbeitete Auflage, Stuttgart, Thieme Verlag, 1987

36 Torti FM, Lum BL: The biology and treatment of superficial bladder cancer, J Clin Oncol 2:505, 1984

37 Wülfing C., Abstract zur Vorlesung von Wülfing C., Dr. med., Urologische Klinik und Poliklinik, Med. Einrichtungen der westfälischen Wilhelms- Universität Münster über „ Metallothionein- ein Marker für Prognose und Chemotherapie-Resistenz beim Harnblasenkarzinom ?“ anlässlich der 43. Tagung der Nordrhein westfälischen Gesellschaft für Urologie Urologie am 15-17 April 1999

7 Anhang

7.1 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. H. Jung für de Erlaubnis zur Durchführung der Untersuchungen am Institut für Biophysik und Strahlenbiologie der Universität Hamburg,

Herrn Prof. Dr. H. Baisch für die freundliche, wissenschaftliche Betreuung und stete Bereitschaft zur Hilfe bei der Interpretation der Untersuchungsbefunde,

Herrn Dr. Schwaiboldt für das zur Verfügung stellen der Blasenspülungen und der klinischen Befunde,

Frau Bornkessel für die vielfältige Unterstützung bei der praktischen Durchführung der flusszytometrischen Untersuchungen

7.2 Lebenslauf

Name: Zick
Vorname: Melanie
Geburtsdatum: 09.10.1972
Geburtsort: Wilhelmshaven
Familienstand: ledig

Eltern Manfred Zick
Marianne Zick, geb. Schwinge

Adresse: Rugierweg 21c, 22453 Hamburg
Telefon: 040/ 531 83 80

Schulbildung

1979 - 1983 Grundschule Rüstersiel
1983 - 1985 Orientierungsstufe Franziskusschule
1985 - 1992 Käthe-Kollwitz Gymnasium

Schulabschluß

05.92 Abitur

Sozialdienst

08.92 - 04.93 freiwilliges soziales Jahr im Kindergarten Inselviertel,
während dieser Zeit Ausbildung zur Skilehrerin

Studium

04.93 Beginn des Zahnmedizinstudiums, SS
04.94 naturwissenschaftliche Vorprüfung
10.96 zahnärztliche Vorprüfung
02.99 – 07.99 Staatsexamen Zahnmedizin

Berufliche Tätigkeit

seit 01.10.99 als Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dr. Lindauer und Partner

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Angabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Melanie Zick