

Nachweis minimaler zirkulierender Tumorzellen mit Hilfe mikrofluorimetrischer Analysen am Laser Scanning Cytometer (LSC®)

Argumentation

Die tumorverdächtigen Zellen werden automatisch und vom Untersucher unabhängig erfasst, sie können einzeln wiederaufgesucht, visualisiert und, falls erforderlich, mit weiteren Analyseverfahren bearbeitet werden. Diese Methode ermöglicht die quantitative Analyse von Tumorzellen aus einem vertretbaren Volumen Blut und damit eine zeitgerechte Beobachtung der ausgeschwemmten Tumorzellen und ihr Ansprechen auf die Therapie.

Für die Zellanalyse müssen nur die Erythrozyten lysiert werden. Die weißen Blutzellen werden dann mit Magnetbeads (Labsort Diagnostics Halle, Deutschland) versetzt und gleichzeitig ein fluoreszenzmarkierter anti-epithelialer Antikörper (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) zugegeben. Nach einer halbständigen Inkubation können die Ependorfcups mit den Zellen in einen mitgelieferten Magneten gestellt werden und werden dort unter mehrmaligem vorsichtigem Überkopfschwenken für weitere 30 Minuten belassen. Nicht an der Röhrenwand anhaftende Zellen können nun vorsichtig abpipettiert werden, die übrigen Zellen nach dem Entfernen des Röhrens aus dem Magneten mit Puffer aufgeschwemmt und der Messung zugeführt werden. Diese erfolgt auf Adhäsionsobjektträgern, nachdem die Zellen dort als Einzelsuspension aufgebracht worden sind. Die Messung erfolgt in einem Laser Scanning Cytometer (LSC® CompuCyte Corporation, Cambridge, MA, USA), 3000 bis 50 000 Zellen werden im Vorwärtslicht konturiert und mit einem 20fachen Objektiv gemessen. Die dynamische Korrektur des Hintergrundes ermöglicht eine gleichförmige Fluoreszenzberechnung für alle Zellen. Die Zellen können anschließend aufzentriert werden und mit einer fluoreszenzbasierten Kernfärbung oder morphologisch nachgefärbt werden. Aus den gemessenen Werten erstellt die WinCytel™ Software Histogramme oder Punktdiagramme.

Katharina M. Pachmann
Labor für spezielle Immunhämatologie und
Genagnostik, Bayreuth
Brandenburger Straße 30 · 95448 Bayreuth
Klinik für Innere Medizin II der
Friedrich-Schiller-Universität Jena Germany

Zusammenfassung

Solide Tumoren sind nach Herz-Kreislauferkrankungen die häufigste Todesursache in den Ländern der westlichen Welt. Abstellungen des Tumors in die verschiedenen Organe führen schließlich zum Versagen dieser Organe und zum Tod. Ausgang für die Metastasen sind disseminierte Tumorzellen, die aus dem Tumor ausgeschwemmt worden sind. Durch den Einsatz von immunmagnetischen Anreicherungsverfahren und Immunmikrofluorimetrie konnte wir die Nachweisempfindlichkeit für im Blut zirkulierende epitheliale Zellen soweit erhöhen, daß ein qualitativer und quantitativer Nachweis tumorverdächtiger Zellen möglich wird (1).

Abb. 1
Punktdiagramm und Histogramm einer Blutprobe bei der die tumorverdächtigen Zellen (im grünen Fenster) auf etwa 23% angereichert worden sind. Die dichte schwarze Punktwaile entspricht den HEA-negativen normalen Blutzellen.

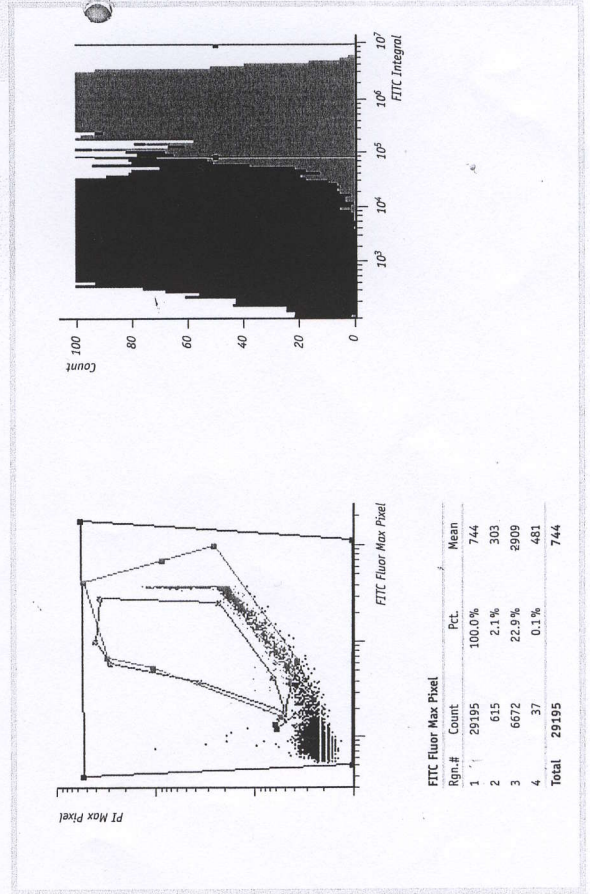
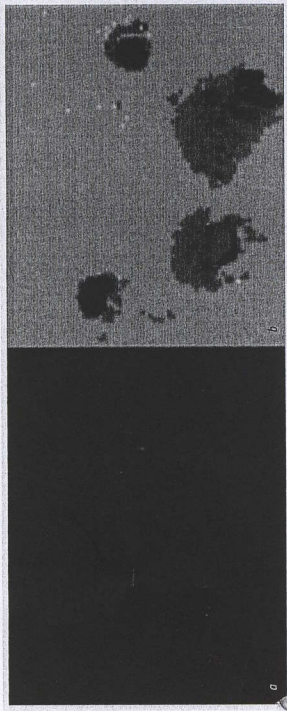


Abb. 2:

Eine einzelne Epithelantigen-positive Zelle mit kappenförmiger Anfärbung. Nach panoptischer Färbung sind noch weitere Zellen neben der rechts gelegenen positiven Zelle zu sehen, die sich nicht angefärbt haben.



Die Tumorzellen können von den verbliebenen Blutzellen auf Grund ihrer Fähigkeit den fluoreszenzmarkierten, gegen Epithelzellen gerichteten Antikörper zu binden, differenziert werden.

In Abbildung 1 ist eine solche Auswertung einmal als Punktdiagramm und einmal als Histogramm dargestellt. Dabei wird das Fenster so gesetzt, daß die negative Population einer normalen Blutzellpopulation ohne Tumorzellbeimischung entspricht. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, ist eine solche Abgrenzung recht eindeutig möglich. In einem Modellsystem konnten wir zeigen, daß die Korrelation zwischen erwarteten und gemessenen Werten mit 0,98 sehr hoch war.

Die Fähigkeit des LSC®, für jedes gemessene Ereignis die Koordinaten zu speichern, ermöglicht es dem Untersucher, jede gewünschte Zelle mit bestimmten Fluoreszenzeigenschaften nochmals im Mikroskop zu betrachten. Tumorverdächtige Zellen können so auf Grund der typischen kappenförmigen Oberflächenmarkierung identifiziert werden und auch panoptisch gefärbt wiederaufgesucht werden (Abbildungen 2a und b).

Dadurch können fragmentierte Zellen oder Zellen mit intrazellulärer Anfärbung oder Zellen ohne intakten Kern ausgeschlossen werden. Nur die Re-lokalisierung erlaubt somit die eindeutige Identifikation vitaler Tumorzellen. Mehrere Studien, in denen immunologische, morphologische und Genanalysen mit Hilfe der FISH Technik zur weiteren Charakterisierung der Zellen kombiniert werden, sind jetzt angelaufen.

Referenzen

- 1 K. Pachmann, P. Heiß, U. Demel, G. Titz: Detection and enumeration of minimal numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using Laser Scanning Cytometry (LSC®). Clin Chem Lab Med 2001, 39:1511-17