



# Der erythrozytennahe Plasmaproteinfilm als Indikator

## Grundlagen für eine mikroskopische Krebsfrühestdiagnose

von Prof. em. Dr. med. habil. Arno Linke

veröffentlicht in SANUM-Post Nr. 18/1992, Seite 13 - 16

Zweifellos gehören die malignen Neoplasien zu den Erkrankungen mit einer zunehmenden Häufigkeit. Schon spricht das Bundesgesundheitsamt von täglich ca. 500 Krebstoten in Deutschland und rechnet noch in diesem Jahr (1991) mit etwa 330000 Neuerkrankungen. Auf die Frage nach den Ursachen dieser Entwicklung wird immer wieder deutlich, daß zwischen dem eigentlichen Beginn der Krebskrankheit, also ihrem biologischen Start bzw. der malignen Transformation der zuerst betroffenen Zellverbände, und der Möglichkeit eines instrumentellen Tumornachweises ein Intervall von 3 bis 5 Jahren bestehen kann, je nach Tumorart und Alter der Patienten. Etwa mit dem gleichen Zeitraum kann bis zum Auftreten der ersten Symptome gerechnet werden. Im krassen Gegensatz dazu aber steht (ebenfalls in Abhängigkeit von Tumorart und dem Alter der Patienten) die Möglichkeit einer sehr frühen Metastasenbildung, deren Beginn bereits mit der 12. Tumorzellverdoppelung (d.h. rein rechnerisch bei ca. 4000 Tumorzellen und einem Tumordurchmesser von nur 0,6 mm) angenommen werden kann.

Dieses Intervall von etwa 3 bis 5 Jahren muß mit Ausnahme der Zervix- und Hautkarzinome für alle anderen malignen Neoplasien als die entscheidende und tragische Dunkelphase in der Krankengeschichte eines Krebspatienten betrachtet werden. Denn prinzipiell ist ja ein erkannter Krebs bereits unmittelbar nach seiner Entstehung schon therapierbar! Jedoch gehört die Realisierung

dieser Möglichkeit bislang meist noch ins Reich der Utopie, weil ja seine Existenz, von Ausnahmen abgesehen, zu solch einem frühen Zeitpunkt noch gar nicht bekannt sein kann, von seiner Lokalisation ganz zu schweigen. Und selbst wenn es in absehbarer Zeit gelänge, den Grenzbereich der instrumentellen Tumornachweismöglichkeit zeitlich in Richtung auf den biologischen Start, also zum Beginn des eigentlichen Tumorzustands, hin vorzulegen, bliebe immer noch die Frage nach dem Wann? - sollen diese Bemühungen nicht in ein instrumentelles Screening ausarten, vom finanziellen Aufwand ganz abgesehen. Natürlich sind die Karzinome der Haut und die der Zervix uteri aus dieser Betrachtung ausgenommen.

Bekanntlich aber wachsen die Aussichten auf Dauerheilung einer Krebserkrankung mit dem frühestmöglichen Einsatz einer auf das jeweilige Malignom abgestimmten Therapie. Mit anderen Worten: Selbst unter Einbeziehung bester Behandlungsmöglichkeiten in die jeweiligen Überlegungen zur wirksamen Hilfe für die Krebspatienten konzentriert sich das Problem Krebs letztlich auf einen WETTLAUF MIT DER ZEIT, nämlich zwischen Tumorzustand und seiner Frühestanze.

### Ein Indikator wurde gesucht und gefunden

Auf der Suche nach einem Indikator, der imstande ist, den biologischen Start einer Krebserkrankung, also den Beginn einer malignen

Transformation der zuerst betroffenen Zellverbände zuverlässig und reproduzierbar anzuzeigen (etwa im Sinne von: Kein Rauch ohne Feuer), bot sich uns die Untersuchung des erythrozytennahen Plasmaproteinfilms (PPF) an. Diese Eiweißhülle der roten Blutkörperchen von gesunden und kranken, insbesondere aber von kranken Menschen sowie einiger anderer Vertebraten, verdient besonderes Interesse.

Beim PPF handelt es sich um eine adsorptive Anreicherung von mindestens vier verschiedenen Blutplasmaproteinen an der Erythrozytenoberfläche ( $\alpha_2$ -Makroglobulin, IgG, Fibrinogen und Präalbumin). Im Krankheitsfall werden die sich dabei bildenden Fremd- und immunkompetenten Proteine sowie Eiweißsubstanzen aus Zellzerfallsprodukten oder mikroorganismischer Herkunft ebenfalls adsorptiv an die Erythrozytenoberfläche gebunden. Dabei dienen die von den Fremdproteinen aus der Eiweißhülle der Erythrozyten „herausgesprengten“ natürlichen Proteine dem Körper als sofort verfügbare Eiweißreserve.

Durch diese Vorgänge wird die Oberfläche der Erythrozyten so stark verändert, daß sie genau wie die überalterten roten Blutkörperchen in der Milz festgehalten und dort samt ihren Fremdproteinen abgebaut und somit unschädlich gemacht werden. Daher lassen sich die Erythrozyten, zusätzlich zu ihren klassischen Funktionen, mit einer Art körpereigener „Müllbeseitigung“ vergleichen. Dem kommt ihre große Menge, ihre enor-



me Reproduzierbarkeit sowie ihre Eigenschaft als kleinste Zelle des Körpers nur entgegen.

Mit Hilfe eigens entwickelter präparativer und färbetechnischer Behandlungen von Blutaussstrichen fand LINKE bei deren Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop bei polychromatischer, also weißer Objektbeleuchtung, daß die Erythrozyten gesunder Personen von einer hellleuchtend blauen Randzone umgeben sind. Diese im Weltmaßstab erstmalige und jederzeit reproduzierbare Beobachtung wurde zur Grundlage des OPTISCHEN ERYTHROZYTENTESTS (OET).

Die Erythrozytenrandzone (ERZ) von roten Blutkörperchen gesunder Erwachsener hat eine Breite von 0,35 bis 0,60  $\mu$ m und eine Dicke zwischen 0,05 und 0,3  $\mu$ m. Im Rasterelektronenmikroskop stellt sie sich als Torus von halbelliptischer Form mit der gleichen Ausdehnung dar. Seine Masse wurde von uns mit  $3,48 \times 10^{-12}$  g Protein pro Einzelerythrozyt ermittelt. Die dadurch ersetzbare intravasale Blutplasma proteinmenge beträgt somit etwa 45% des Gesamtplasmaeiweißes für den Fall, daß alle Erythrozyten eines Organismus ziemlich gleichzeitig von Fremdproteinen besetzt sind; das ist eine beachtliche Proteinreserve für einen eventuellen allergischen Schock. Hierbei sei erwähnt, daß die ERZ, die ja ohnehin den größten Anteil an der Gesamtmenge des PPF hat, bei Tieren mit stärker belasteten Immunsystemen, z.B. der Ratte, deutlich kräftiger ausgeprägt ist. Durch gemeinsam mit MÜHLIG durchgeführte Untersuchungen wurde gesichert, daß die Bewertung und Klassifizierung der ERZ und ihrer krankheitsbedingten Veränderungen mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops eindeutig und zuverlässig in 15 wertfreie Stufen möglich ist. So entstand der Parameter Phasenkontrastwert (PW) als unverzichtbarer Bestandteil des Optischen Erythrozytentests (Bilder 1 a und 1 b).

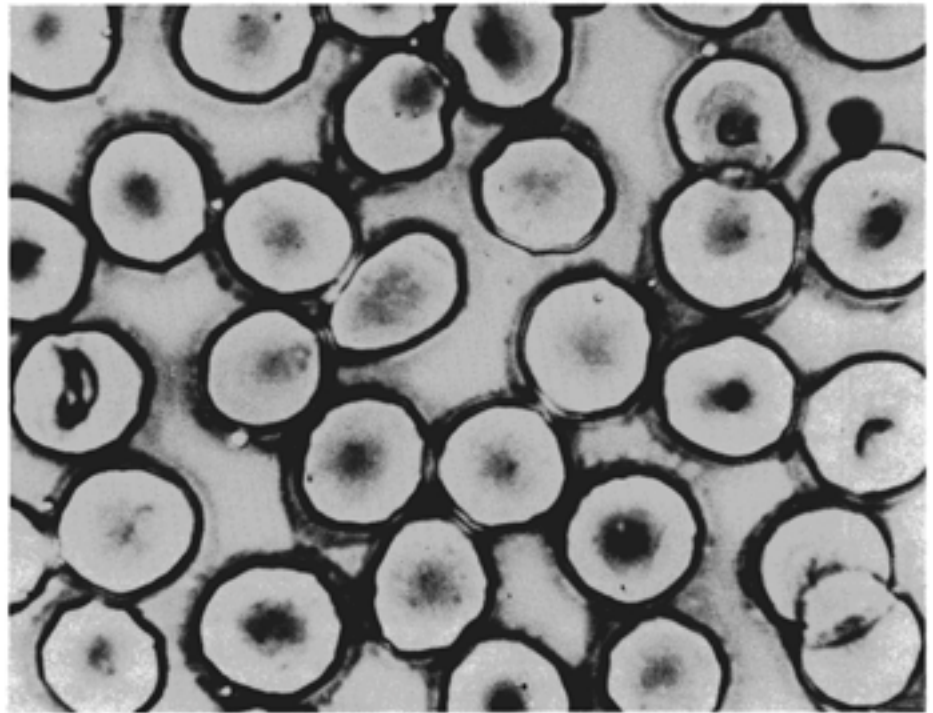


Bild 1a: Erythrozyten eines gesunden Menschen auf einem nach unserem Verfahren behandelten Blutaussstrich in phasenkontrastmikroskopischer Darstellung: PW = 2,4/EVI = 37%.

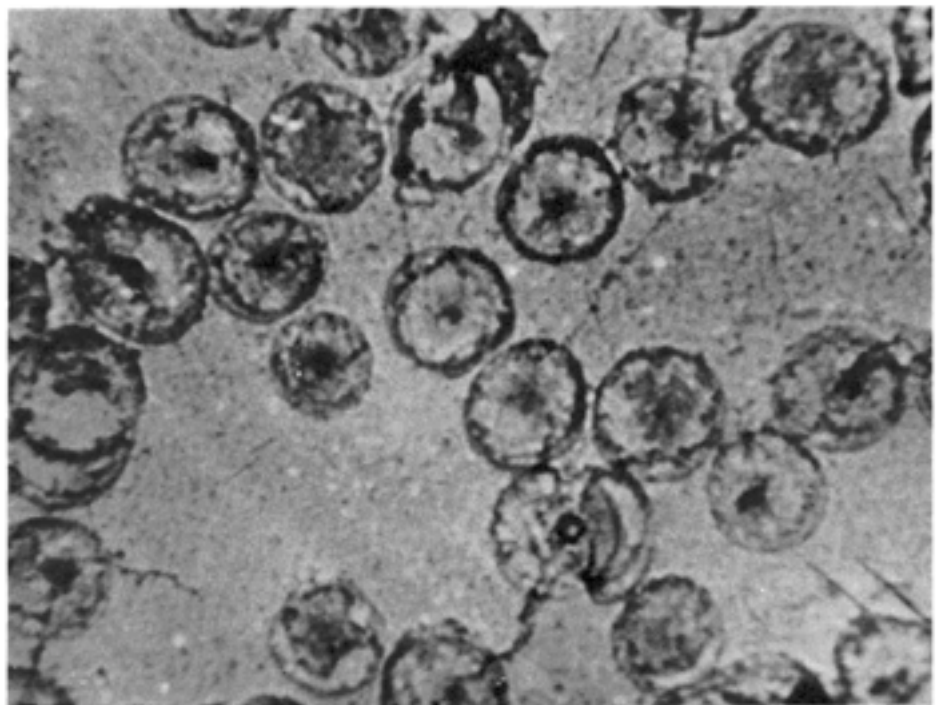


Bild 1b: Erythrozyten auf einem nach unserem Verfahren behandelten Blutaussstrich einer Patientin mit einem Carcinoma in situ der Portio cervicis uteri: PW = 9,5/EVI = 98%.

### Verfahren bietet umfassende Informationen

Mit dem gleichen Präparations- und Färbeverfahren kann auch der Pallorbereich der Erythrozyten zur Informa-

tionsgewinnung über bestimmte biologische Körperzustände herangezogen werden. Der normalerweise optisch „leer“ erscheinende Pallor enthält nämlich beim Vorliegen proliferations-



tiver Prozesse und anderer Zellteilungsprozesse (maligner wie benignen Natur, einschließlich des physiologischen Körperwachstums) amorphe Strukturen als Folge der Ablagerung auch metallhaltiger Proteine, z. B. Hämoglobin, Coeruloplasmin, Transferrin bzw. deren Fragmente. Diese Strukturen, die sich auch rasterelektronenmikroskopisch darstellen lassen, führen zu dem Begriff der veränderten Erythrozyten. Ihr prozentuales Verhältnis zu den unveränderten (= strukturlosen) Erythrozyten im mikroskopischen Blickfeld führt zu dem Parameter Erythrozytenveränderungsindex (EVI).

Mit dem Meßwertpaar PW/EVI (PW als Ordinaten- und dem EVI als Abszissenwert, letzterer in Prozentzahlen ausgedrückt) wurde von uns ein binäres oder auch zweidimensionales Klassifikationssystem entwickelt. Es gibt Auskunft über normale oder gesteigerte immunologische Aktivitäten sowie über die Existenz intoxikations- bzw. strahlenbedingter Fremdproteine einerseits und über die Intensität der Zellteilungsprozesse bzw. der proliferativen Prozesse andererseits. Dieses Koordinatensystem wurde mit Hilfe des statistischen Prüfverfahrens nach KOLMOGOROV-SMIRNOV anhand von 2832 überprüften Einzel-

ergebnissen durch zwei Entscheidungsgrenzen (für den PW = 4,5 und für den EVI = 65%) in vier Felder eingeteilt, die folgende biologische Zustände beinhalten (Bild 2):

Feld 1:  $PW < 4,5$  und  $EVI < 65\%$ : Nicht gesund, aber ohne das Vorliegen maligner Neoplasien (MN). Erst wenn das Meßwertpaar die Werte  $PW \leq 2,5$  und  $EVI \leq 40\%$  aufweist, kann mit einer Sicherheit von 98% (!) völlige Gesundheit konstatiert werden.

Feld 2:  $PW < 4,5$  und  $EVI > 65\%$ : Ausgeprägte Steigerung von Zellteilungsprozessen ohne überkritische immunologische Aktivitäten: Krankheiten ohne MN.

Feld 3:  $PW > 4,5$  und  $EVI > 65\%$ : Ausgeprägte bis hin zu maximal gesteigerte immunologische Aktivitäten plus stark bis exzessiv ausgeprägte Zellteilungsprozesse zeigen mit einer statistischen Sicherheit von 96% die Existenz maligner Neoplasien an, und zwar bereits etwa ab ihren 3. bis 5. Tumorzellteilungen. Das begründet unsere Definition der Krebsfrühestanzeige dieses Verfahrens.

Feld 4:  $PW > 4,5$  und  $EVI < 65\%$ : Überkritische Beladung der ERZ mit Fremdproteinen aus allergischer, toxischer, aber auch radiologischer Genese ohne überkritische Häufigkeit von Zellteilungsprozessen: Kein sicherer Hinweis auf das Vorliegen von MN.

Dieses visuelle Klassifikationsverfahren, der OET also, erlaubt die sinnvolle Einordnung beliebiger Meßwertpaare und damit auch eine schnelle Orientierung unter den drei Möglichkeiten: Gesund - Nicht gesund ohne MN - Maligne Neoplasie mit einer Sicherheit von 96% vorhanden. Ein geübter Untersucher benötigt für die Auswertung eines Präparates, je nach Fragestellung und dem Schweregrad der Erkrankung, im Mittel zwischen 3 und 7 Minuten.

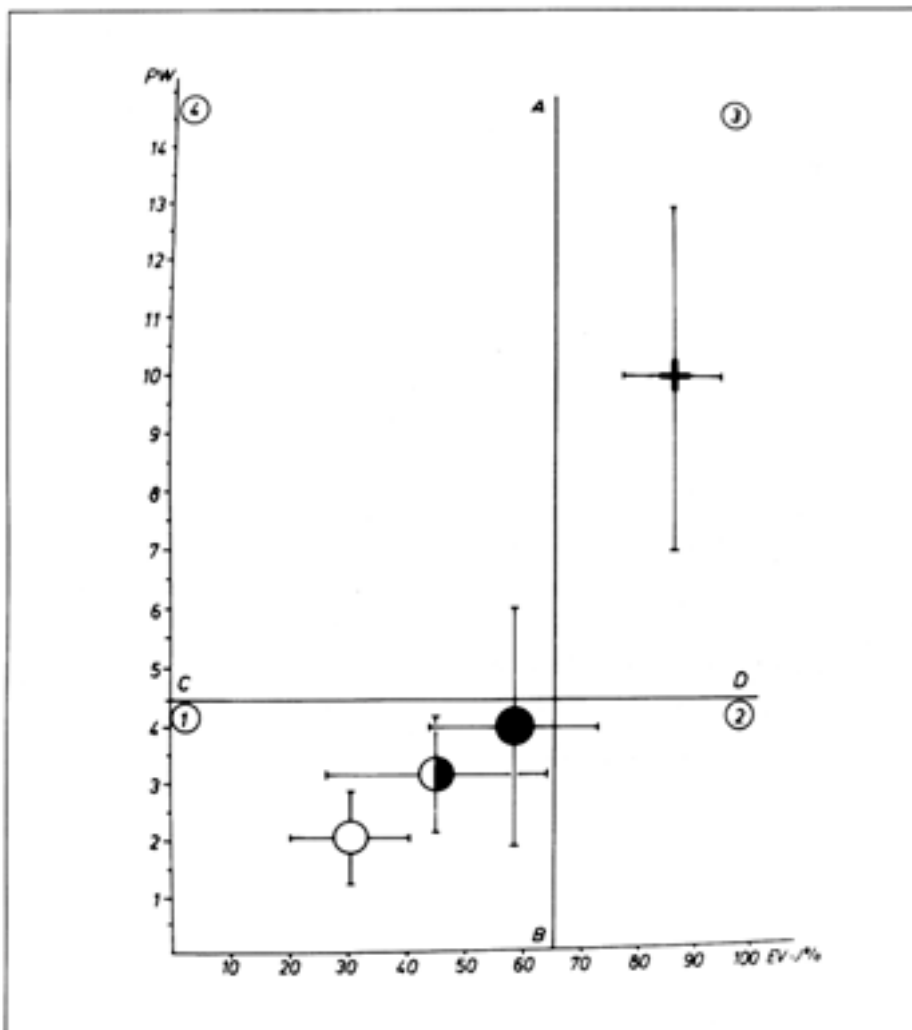


Bild 2: Mittelwerte und Streuungen der Meßwertpaare PW/EVI der Gruppe a) mit 145 gesunden Personen, Symbol: ○; Gruppe b) mit 163 Patienten ohne maligne Neoplasien, Symbol: ● und Gruppe c) mit 141 krebserkrankten Patienten, Symbol: +. Das Symbol ● steht für die Mittelwerte und Streuungen der Gruppen a + b. Alle Mittelwertdifferenzen sind hochsignifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$ .



## Präanalytische Faktoren sind genau einzuhalten

Eine unbedingte Voraussetzung für die Gewinnung zuverlässiger Ergebnisse ist die Einhaltung bestimmter präanalytischer Faktoren, die in dem unten angekündigten Buch ausführlich behandelt werden. Zahlreiche rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unserer Präparate dienen der Erkenntnisgewinnung über strukturelle Details des PPF unveränderter oder mit Fremdproteinen belasteter Erythrozyten und stellen damit einen unverzichtbaren Beitrag zur Grundlagenforschung über diese Thematik dar.

Im Zeitraum von 1973 bis 1988 haben wir mehr als 5500 Bestimmungen des EVI bzw. des OET (einschließlich 389 Untersuchungen mit der automatischen Bildanalyse) an über 4600 Probanden und Patienten sowie an Tieren durchgeführt. Darin sind u.a. enthalten die 449 Probanden und Patienten, deren Meßwertpaare zu den in Bild 2 dargestellten Mittelwerten führten, sowie 747 Meßergebnisse an Blutaussstrichen von ebensoviel Personen für zwei Doppelblindstudien, die ausschließlich unter der Fragestellung „Krebs vorhanden? - Krebs nicht vorhanden?“ durchgeführt wurden. Dabei wurde die extrem hohe Trennschärfe des OET deutlich, die sich auch in den Kriterien der diagnostischen Bewertung ausdrückt, nämlich:

Sensitivität: 0,96  
Spezifität: 0,92  
Relevanz: 0,87  
Segreganz: 0,98  
Effizienz: 0,94.

Neben der Beantwortung der bereits genannten Fragestellungen aus der Onkologie eignet sich der OET auch sehr gut zum Hinweis auf PPF-Veränderungen, wie sie nachweislich auch vorkommen können:

- nach geringsten Strahlenexpositionen, z.B. von Atomkraftwerken oder artverwandten Einrichtungen;

- nach unsachgemäßem Umgang mit Herbiziden/Insektiziden oder ähnlichen Noxen aus Landwirtschaft und Industrie;
- bei Gewässerverschmutzung, z.B. mit Bleiverbindungen bereits in Schadstoffkonzentrationen von nur 1:15000000;
- in der Veterinärmedizin im Zusammenhang mit der frühzeitigen Erkennung von bestimmten und übertragbaren Leukoseformen.

## Test besitzt volle Praxisrelevanz

Die unbestreitbar vorhandene Praxisrelevanz des OET kommt auch dadurch zum Ausdruck, daß er absolut risikofrei und jederzeit reproduzierbar ist, durch die Technik der Blutentnahme aus der Fingerbeere die Patienten nicht belästigt und von ihnen nicht einmal als „Krebstest“ empfunden wird. Sein geringer Materialaufwand von ca. 1,00 DM pro Präparat macht ihn auch für Screening-Untersuchungen geeignet.

Die frühzeitige Anwendung des Tests, d.h. bereits beim Vorliegen der allergeringsten Verdachtsmomente, erhöht die Lebenserwartung von Tumorpatienten beträchtlich. Seine Nichtanwendung wäre bis zur Entwicklung eines besseren Krebstests ethisch nicht vertretbar.

Insgesamt entstanden zur Grundlagenthematik „Erythrozytennaher Plasmaproteinfilm“ sowie zu den sich daraus ergebenden Spezialthemen von 15 Jahren 38 wissenschaftliche Publikationen, zu denen 23 Wissenschaftler (Apotheker, Biologen, Biochemiker, Biophysiker, Mathematiker und Veterinärmediziner aus Berlin, Greifswald, Jena und Rostock) erfolgreich beigetragen haben. Ihnen allen sei an dieser Stelle gedankt.

Ebenfalls danke ich Herrn Reiner Kehlbeck und dem Semmelweis-Verlag sehr für das große Engagement bei der Herausgabe des Buches.

*Nachbemerkung der Redaktion: Dieser Beitrag von Professor Linke nimmt Bezug auf sein Buch „Der erythrozytennahe Plasmaproteinfilm“, das kürzlich im Semmelweis-Verlag, Hoya, erschienen ist und auch bei SANUM-Kehlbeck bestellt werden kann. Was der Autor in seinem Beitrag wie in seinem Buch darstellt, kann man ohne Übertreibung als hochbedeutsam für die diagnostische Medizin ansprechen. Eine breite Anwendung der von ihm entwickelten und vorgeschlagenen Methodik in der Krebsfrüherkennung und darüber hinaus in der Früherkennung und Aufdeckung von anderen ernsten Latenzen wäre im positiven Sinne umwälzend für das herrschende System mit seinen Methoden, die fälschlich als Früherkennungstests deklariert werden. Dem machen sich schuldig nicht nur Krankenkassen, sondern auch gesundheitspolitische Gremien und Organe. Die gebotene breite Einführung des Tests nach Professor Linke hätte daher auch gesundheitspolitisch und in bezug auf die immer noch bedenkliche Krankenkostenentwicklung enorme Folgen im Sinne einer wirklichen Problemlösung. Mit solchen Lösungen kann eine echte Gesundheitsreform eingeleitet werden. Das Buch von Professor Linke kann allen Ärzten und Heilpraktikern wie auch allen anderen, die es angeht, sehr empfohlen werden. Es eröffnet bedeutende Perspektiven.*