

Klassifikation und Prognose kolorektaler Karzinome

Beurteilung mit der Mehrparameter-Durchflußzytometrie

Von R. Wirsching, G. Valet und B. Wiebecke

Die biologisch relevante Klassifikation maligner Tumoren ist Grundlage für Therapieplanung, Therapiekontrolle und Vergleiche von Behandlungsverfahren [15]. Dabei ist es praktisches Ziel jeder Klassifikation, Tumoreigenschaften von signifikanter prognostischer Bedeutung zu erfassen. Für kolorektale Karzinome wird hierzu allgemein die histopathologische Einteilung nach Tumortyp, Tumorausbreitungsstadium und Differenzierungsgrad verwendet [7, 8, 15].

Andere potentiell für die Prognose des Patienten entscheidende Tumoreigenschaften wie zellulärer DNS-Gehalt, Tumorploidie oder Zellmembran-assoziierte Antigene werden aber mit dieser morphologischen Betrachtungsweise nicht erfaßt. Dabei können sich auch histomorphologisch gleichartige Tumoren in ihrem biologischen Verhalten grundlegend unterscheiden [2, 4, 15]. Solche Tumorerogenitäten lassen sich jedoch heute mit der durchflußzytometrischen Mehrparameter-Zellanalyse schnell, objektiv und quantitativ erfassen [3].

Ziel dieser Studie war es, bei Patienten mit kolorektalem Karzinom auf zellulärem Niveau die Parameter DNS-Gehalt bzw. Ploidie* sowie zelluläre CEA-Expression und CEA-Dichte zu bestimmen und ihre Bedeutung für Tumorklassifikation und Prognosebeurteilung zu prüfen.

Patienten und Methodik

DNS- und CEA-Markierung von Einzelzellsuspensionen

In die Studie aufgenommen wurden 137 unausgewählte, elektiv wegen eines kolorektalen Karzinoms an der Chirurgi-

Aus der Chirurgischen Klinik u. Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. med. G. Heberer) der Universität München, Klinikum Großhadern, der Arbeitsgruppe Krebszellforschung (Leiter: Prof. Dr. G. Valet), Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, dem Pathologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. med. M. Eder) der Univ. München.
Herrn Prof. Dr. med. G. Heberer zum 65. Geburtstag gewidmet.

Zusammenfassung

Mit der Mehrparameter-Durchflußzytometrie wurden bei 137 Patienten mit operativ behandeltem kolorektalem Karzinom im Tumorgewebe und in normaler Mukosa Bestimmungen der Ploidie sowie der zellulären Expression des karzinoembryonalen Antigen (CEA) durchgeführt. 59% der Tumoren erwiesen sich als aneuploid, 41% der Tumoren sowie alle Mukosaprobe waren euploid. Die zelluläre CEA-Dichte war individuell sehr unterschiedlich und insgesamt bei Tumoren doppelt so hoch wie bei normaler Mukosa. Aneuploide Tumoren und solche mit niedriger CEA-Dichte befanden

sich zum Zeitpunkt der Operation in weiter fortgeschrittenem Tumorstadium als euploide Tumoren sowie solche mit hoher CEA-Dichte. Auch im weiteren Verlauf zeigten die aneuploiden Tumoren und diejenigen mit niedriger CEA-Dichte signifikant häufiger Tumorrückfälle beziehungsweise eine schlechtere Prognose. Damit ermöglicht die durchflußzytometrische Analyse kolorektaler Karzinome eine verbesserte Erfassung des individuellen Risikos eines Patienten.

Schlüsselwörter: Durchflußzytometrie — kolorektales Karzinom — Tumorklassifikation — Prognose

Summary: Classification and Prognostic Evaluation of Colorectal Carcinomas by Multiparameter Flow-cytometry

The ploidy and the cellular expression of carcinoembryonic antigen (CEA) were measured simultaneously in tumour tissue and normal mucosa by multiparameter flow-cytometry in 137 nonselected patients operated on for colorectal carcinoma. 59% of the tumours were aneuploid, 41% of the tumours and all the mucosa specimens were euploid. The mean cellular CEA-surface density was about twice as high in tumours as in normal mucosa and varied considerably in individual patients. Aneuploid and low-CEA-density tumours were at significantly more advanced stages at the time of operation than were euploid and high-CEA-density tumours. In the follow-up period aneuploid and low-CEA-density tumours showed a significantly poorer prognosis (e.g. tumour recurrence, tumour-related death). Flow cytometric analyses of colorectal tumours may be helpful for further determination of a patient's individual risk.

Keywords: Flow cytometry—colorectal carcinoma—tumour classification—prognosis

schen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. G. Heberer) im Klinikum Großhadern operierte Patienten. Unmittelbar nach dem Eingriff wurden jeweils vom Karzinom und von normaler Kolonmukosa Gewebeprobe entnommen (ca. 0,1–1,0 g), zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet, mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und durchflußzytometrisch analysiert (Einzelheiten siehe [16]).

Dabei werden aus dem Gewebe zuerst durch Zerhacken, Sieben und Filtrieren (bei 0–4 °C) Einzelzellsuspensionen

hergestellt, diese anschließend mehrfach gewaschen, in gepufferte Elektrolytlösung überführt und fixiert. Darauf folgt die Inkubation der Zellen mit einem polyklonalen Anti-CEA-IgG vom Kaninchen (Nachabsorption freundlicherweise vorgenommen von Prof. Dr. R. Lamerz, II. Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern).

Nach Bindung dieses 1. Antikörpers werden die Zellen in direkter Immunfluor-

* In der Durchflußzytometrie auch Begriff für den DNS-Gehalt von Einzelzellen sowie DNS-Verteilung von ganzen Gewebeproben [1].

reszenztechnik mit einem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelten Anti-Kaninchen-IgG-Serum von der Ziege (2. Antikörper) und zusätzlich mit Propidium-Jodid (PJ) zur Markierung der DNS gefärbt. Monodisperse poröse Latexpartikel (\varnothing 5 μ m; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Ugelstad, Universität Trondheim, Norwegen) werden ebenfalls mit FITC gefärbt und den einzelnen Proben als interner Standard für Volumen, Fluoreszenz und Zellkonzentration zugegeben.

Zusätzlich Volumenbestimmung der Einzelzellen

Im *Fluovometricell*-Durchflußzytometer folgt simultan die Messung von DNS-Gehalt, CEA-Expression und Volumen jeder Einzelzelle (ca. $2-5 \times 10^4$ Zellen von jeder Einzelprobe). Nach Computerauswertung werden die Ergebnisse als 3-Parameter-Histogramm sowie als Verteilungskurve jedes Einzelparameters quantitativ berechnet und als Graphik ausgedruckt.

Die DNS-Verteilungskurve (1-Parameter-Histogramm) ermöglicht dabei automatisch die Bestimmung der Ploidie. Für klinische Belange geeignet ist dabei die Unterteilung in euploide (DNS-Index $\leq 1,2$ beziehungsweise aneuploide (DNS-Index $> 1,2$) Gewebe [1, 3, 4].

Weiterhin wird aus der simultanen Messung von CEA-Fluoreszenz, Volumen und Zellzahl der Prozentsatz CEA-positiver Zellen und die mittlere CEA-Dichte auf der Zelloberfläche der analysierten Gewebeproben berechnet.

In der vorliegenden Studie wurde die Bestimmung der Parameter Ploidie sowie CEA-Expression auf die hier relevanten, großen epithelialen Zellen bei Karzinom- und normalen Mukosaproben beschränkt, was erst durch die simultane Mehrparameteranalyse mit exakter Messung des Zellvolumens erreichbar ist.

Histopathologische Aufarbeitung

Nach dieser durchflußzytometrischen Mehrparameteranalyse wurden von jedem Tumor der histologische Differenzierungsgrad (Grad I-III) und das Tumorausbreitungsstadium (Dukes A-D) registriert. Die histopathologische Aufarbeitung der Präparate erfolgte im Pathologischen Institut der Universität München (Direktor: Prof. Dr. M. Eder). Damit war eine Unterteilung in kurativ

(makroskopisch und histologisch im Gesunden keine Fernmetastasen) und nur palliativ operierte Patienten möglich.

Nachuntersuchung

Alle Patienten wurden prospektiv in Intervallen von 3 Monaten nach einem

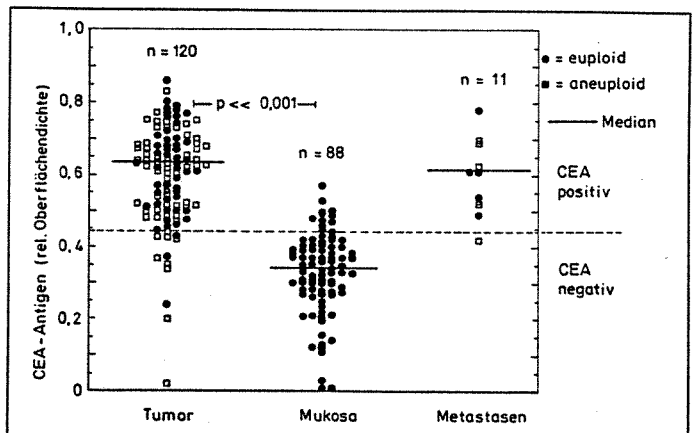
Tabelle 1: Beziehung zwischen Tumorploidie und Tumorstadium (Dukes A-D) zum Zeitpunkt der Operation beim kolorektalen Karzinom (n = 137 Patienten).

Ploidie	Dukes-Stadium [%]				Signifikanz χ^2 -Test
	A	B	C	D	
euploid (n = 55)	22	44	27	7	p < 0,02*
aneuploid (n = 82)	18	28	39	15	

Tabelle 2: Beziehungen zwischen zellulärer CEA-Oberflächendichte und dem Tumorstadium (Dukes A-D) zum Zeitpunkt der Operation bei kolorektalen Karzinomen (n = 117 Patienten).

CEA-Dichte	Dukes-Stadium [%]				Signifikanz χ^2 -Test
	A	B	C	D	
hoch (n = 57)	21	46	26	7	p < 0,02*
niedrig (n = 60)	15	30	37	18	

Abb. 1: Simultane Messung von zellulärer CEA-Oberflächendichte und Ploidie bei kolorektalen Karzinomen (n = 120), zugehörigen Fernmetastasen (n = 11) und normaler Mukosa (n = 88).



standardisierten Nachsorgeschema mit klinischer Untersuchung, Endoskopie, Sonographie, Computertomographie, Röntgenuntersuchung und Serum-CEA-Bestimmung kontrolliert. Dann wurden die Tumorploidie (euploid bzw. aneuploid) sowie die CEA-Dichte (hohe bzw. niedrige Dichte; Grenze: Median aller Proben) dem Tumorstadium sowie dem Auftreten von Tumorrückfällen (Lokalrezidiven, Fernmetastasen) und tumorbedingten Todesfällen gegenübergestellt.

Ergebnisse

Große Unterschiede in der CEA-Dichte

Nach durchflußzytometrischer Analyse wurden 59% (n = 80) der kolorektalen Karzinome als aneuploid und 41% (n = 57) als euploid klassifiziert. Die normale Mukosa war stets euploid.

Bei den Tumoren erwies sich der Prozentsatz CEA-positiver Zellen als individuell sehr schwankender, von 0% bis 90% (Median: 63%) reichender Parameter. Bei der normalen Mukosa betrug der Anteil CEA-positiver Zellen 0% bis 50% (Median: 30%). Die mittlere zelluläre CEA-Dichte war bei Karzinomen etwa doppelt so hoch wie bei gesunder Schleimhaut (Abb. 1). Zwischen Ploidie und CEA-Dichte bestand keine statistische Korrelation.

Die Metastasen verhielten sich bezüglich Ploidie und CEA-Expression gleichartig wie ihre Primärtumoren (Abb. 1).

Beziehung von Ploidie und CEA-Dichte zum Stadium und zur Rezidivrate

Zum Zeitpunkt der Operation befanden sich aneuploide Tumoren signifikant häufiger in einem fortgeschrittenen Sta-

dium (zum Beispiel Duker C und D) als euploide Tumoren (Tabelle 1). Gleichartig waren auch Tumoren mit niedriger CEA-Dichte hier bereits signifikant weiter fortgeschritten (Tabelle 2). Zwischen den einzelnen Gruppen bestand dabei weder bei der Geschlechtsverteilung noch beim Durchschnittsalter statistisch ein Unterschied (t-Test).

Im postoperativen Verlauf der 104 kurativ operierten Patienten fand sich bei aneuploiden Karzinomen ein signifikant häufigeres Auftreten von Tumorrückfällen (Abb. 2), Fernmetastasen (Abb. 3) und tumorbedingten Todesfällen (Abb. 4). Auch bei Betrachtung einzelner Tumorstadien (Tabelle 3), waren jeweils in der aneuploiden Gruppe erheblich mehr Tumorrückfälle festzustellen.

Die Klassifikation nach dem histologischen Differenzierungsgrad (Grad I = 2,9%, II = 72,3%, II-III = 13,1%, III = 11,7%) ergab keinerlei Korrelation zum weiteren postoperativen Verlauf der kurativ operierten Patienten (Tab. 4).

Diskussion

Alleinige Berücksichtigung der relevanten epithelialen Zellen

Eine Unterteilung in euploide und aneuploide Tumoren hat sich für zahlreiche Malignome als biologisch relevante Charakterisierung und Klassifikation erwiesen [1, 3, 5]. Für klinische Belange üblich ist dabei die Differenzierung in diploide beziehungsweise nahezu diploide („euploide“) und aneuploide (DNS-Index > 1,2) Tumoren [1, 3, 12, 13]. Die Aneuploidie-Rate von 59% der hier untersuchten kolorektalen Karzinome liegt im Bereich von 50% bis 78%, wie auch in anderen, meist kleineren, Studien angegeben [1, 5, 12, 13]. In Übereinstimmung mit allen anderen durchflußzytommetrischen Analysen war in der vorliegenden Studie die normale Mukosa stets euploid.

Darüber hinaus konnten hier erstmals gemeinsam auf Einzelzellniveau CEA, DNS und Zellvolumen und damit die CEA-Dichte auf der Zelloberfläche bestimmt werden. Dabei bestätigte sich auch hier (Abb. 1) die bekannt hohe Variabilität sowie die fehlende Tumorspezifität von CEA [9]. Zwischen der insgesamt höheren CEA-Dichte der Karzinome und der niedrigeren Dichte der normalen Mukosa waren zwar Überschneidungen vorhanden, die Abgrenzung aber deutlich schärfer als bei den bislang vorliegenden immunhistochemi-

schen Untersuchungen [12]. Die durchflußzytommetrische Mehrparameteranalyse mit simultaner, exakter Erfassung des Zellvolumens sichert dabei die alleinige Berücksichtigung der relevanten epithelialen Zellen [16].

Schlechtere Prognose aneuploider Karzinome

Die biologische Bedeutung des Parameters DNS-Gehalt beziehungsweise Ploidie für Identifikation, Klassifikation und Prognosebeurteilung konnte bereits durch etliche zytophotometrische und in neuerer Zeit vermehrt auch durchflußzytommetrische Analysen nachgewiesen werden [2, 3, 4]. Dabei erwies sich Aneuploidie nahezu stets verbunden mit schlechterer Prognose. Die gegenüber der Zytophotometrie rascher und an wesentlich höheren Zellzahlen durchführbaren durchflußzytommetrischen Untersuchungen waren bislang bei den soliden kolorektalen Karzinomen, wohl wegen der problematischen Gewebeverarbeitung, selten beziehungsweise auf kleine Tumorserien beschränkt [6, 12, 13]. Hier konnte nun für Dickdarmkarzi-

nome eine signifikante Korrelation zwischen Aneuploidie und weiter fortgeschrittenem Tumorstadium (Tabelle 1) – also Anhalt für ein maligneres Verhalten – nachgewiesen werden. Gleichartige Beziehungen waren schon für Karzinome von Magen und Ösophagus [14] sowie Blase und Prostata [5] festgestellt worden. Für kolorektale Karzinome hatte man bislang in kleineren Patientenkollektiven noch keine Korrelation zwischen Tumorstadium und Ploidie registriert [5, 12].

Die meist schlechtere Prognose aneuploider Karzinome [2, 3, 4] bestätigte sich auch hier für Kolon- und Rektumtumoren deutlich am postoperativen Verlauf mit gehäuftem Tumorrückfall und tumorbedingtem Tod (Abb. 2-4). Die ungünstigere Prognose war dabei nicht allein Folge der bereits bei der Operation weiter fortgeschrittenen Tumorausbreitung (Tabelle 3).

Keine Korrelation mit histologischem Differenzierungsgrad

Der histologische Differenzierungsgrad

Tabelle 3: Tumorrückfälle (Fernmetastasen und Rezidive) nach kurativer Operation wegen kolorektalem Karzinom in Abhängigkeit vom Tumorstadium und von der Tumorploidie.

n = 88 Patienten, Nachbeobachtungszeit 6 bis 33 Monate, Median 20 Monate.

DNS-Gehalt	Dukes A.	Rezidiv-Metastasen	Dukes B	Rezidiv-Metastasen	Dukes C	Rezidiv-Metastasen
euploid (n = 36)	9	→ 0	21	→ 1	6	→ 0
aneuploid (n = 52)	13	→ 0	19	→ 5	20	→ 8

Tabelle 4: Beziehungen zwischen Tumorploidie und Prognose sowie zwischen histologischem Differenzierungsgrad und Prognose bei kurativ operierten Patienten mit kolorektalem Karzinom.

n = 88 Patienten, Nachbeobachtungszeit 6 bis 33 Monate, Median 20 Monate.

Klinischer Verlauf	Differenzierungsgrad		Signifikanz	Signifikanz		
	G 1, G2 (n = 66)	G 2-3, G3 (n = 22)		euploid (n = 36)	aneuploid (n = 52)	
Lokalrezidiv	9%	0%	n.s.*	3%	10%	n.s.*
Metastasen	12%	9%	n.s.*	3%	17%	p < 0,05*
Gesamt-Tumorprogression	18%	9%	n.s.*	3%	25%	p < 0,01*
Tumorabhängig verstorben	6%	9%	n.s.*	0%	12%	p < 0,05*

* χ^2 -Test, Fisher-Test, zweiseitig

wird beim kolorektalen Karzinom bei der Malignitäts- und Prognosebeurteilung und damit auch für die individuelle Therapieplanung allgemein beachtet [11]. Hier ergab sich jedoch keine Korrelation zwischen dem Parameter Differenzierungsgrad und dem klinischen Verlauf (Tabelle 4). Auch in anderen Untersuchungen blieb die Relevanz einer Einteilung nach dem histologischen Differenzierungsgrad gering [8]. Mögliche Ursachen sind die Subjektivität der morphologischen Analyse, die problematische Quantifizierbarkeit sowie die wenig exakte definierte Abstufung in Grad I–III [3, 15].

Zelluläre CEA-Expression prognostisch verwertbar

Die prätherapeutische Serumkonzentration von CEA ist bei den Karzinomen von Kolon und Rektum ein prognostisch

bedeutender Parameter [9, 17]. Die klinische Nutzbarkeit beschränkt sich aber auf die 45% bis 60% hier schon im Serum CEA-positiven Tumoren. Die größere Bedeutung der CEA-Analyse liegt bislang bei der postoperativen Therapiekontrolle sowie der Entdeckung etwaiger Tumorrückfälle.

Die hier gemessene zelluläre CEA-Dichte erwies sich nun ebenfalls als ein Parameter von signifikanter biologischer Bedeutung (Tabelle 2 und Abb. 5). Sie ist für jeden Tumor bereits zum Zeitpunkt der Behandlung bestimmbar und damit, anders als das Serum-CEA, für alle Patienten zur individuellen Prognosebeurteilung verwendbar. Erste Hinweise auf eine Korrelation zwischen zellulärer CEA-Expression und dem klinischen Verlauf hatten bereits immunhistochemische Analysen ergeben [10].

Resümee

Insgesamt erwiesen sich in unseren Untersuchungen Tumorploidie und zelluläre CEA-Dichte für kolorektale Karzinome als biologisch relevante Parameter, die mit der Mehrparameter-Durchflußzytometrie einfach, rasch quantitativ und sogar präoperativ aus Biopsien meßbar sind. Die so erreichbare bessere Kenntnis des individuellen Risikos des Patienten kann eine entscheidende Hilfe sein bei der Therapieplanung sowie der Tumornachsorge. Die Möglichkeit, diese durchflußzytometrische Analyse zu standardisieren und zu automatisieren [16], könnte Grundlage sein zu breiterer klinischer Prüfung und Anwendung.

Literatur

1. Barlogie, et al.: Amer. J. Med. 195–203 (1980).
2. Barlogie, B., et al.: Cancer Genet. 6, 17–28 (1982).
3. Barlogie, B., et al.: Cancer res. 43, 3982–3997 (1983).
4. Böhm, N., Sandritter, W.: In: Grundmann, E., Kirsten, W. H. (Eds.): Current topics in pathology, Vol. 60. Springer, Berlin, 1975, pp. 152–219.
5. Frankfurt, O. S., et al.: Cytometry 5, 71–80 (1984).
6. Frankfurt, O. S., et al.: In: 2. Clinical Flow Cytometry, Am. Engin. Foundation (Abstr.), Georgia, Sea Island, 1983, pp. 81.
7. Hardcastle, J. D., Vellacott, K. D.: In: Duncan, W. (Ed.): Colorectal Cancer. Springer, Berlin, 1982, pp. 86–100.
8. Hermanek, P.: In: Sobin, L. H. (Ed.): Atlas of colorectal tumors. Butterworth Scientific, London, 1983, pp. 81–137.
9. Lamerz, R., Fateh-Moghadam, A.: Klin. Wschr. 53, 193–203 (1975).
10. Lindgren, J., et al.: Histochemistry. 74, 223–227 (1982).
11. Lockhart-Mummery, H. E., Ritchie, J. K., Hawley, P. R.: Brit. J. Surg. 63, 673–677 (1976).
12. Rognum, T. O., et al.: Brit. J. Cancer 45, 921–934 (1982).
13. Rognum, T. O., et al.: In: Laerum, O., Lindmo, T., and E. Thorud (Eds.): Flow cytometry IV, Universitetsforlaget Bergen, Bergen, 1980, pp. 417–423.
14. Sannohe, Y., Hiratsuka, R.: Gastroenterol. JPN 16, 25–32 (1981).
15. Sugarbaker, P. H., Macdonald, J. S., Gunderson, L. L.: Colorectal cancer. In: DeVita jr., V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. (Eds.): Cancer – Principles and practice of oncology. J. B. Lippincott, Philadelphia, 1982, pp. 643–681.
16. Valet, G., Rüssmann, L., Wirsching, R.: J. Clin. chem. clin. Biochem. 22, 935–942 (1984).
17. Zamcheck, N., et al.: Human pathol. 6, 31–45 (1975).

Für die Verfasser:

Dr. med. R. Wirsching, Chirurgische Klinik und Poliklinik der Universität München, Klinikum Großhadern, Marchioninistr. 15, D-8000 München 70.

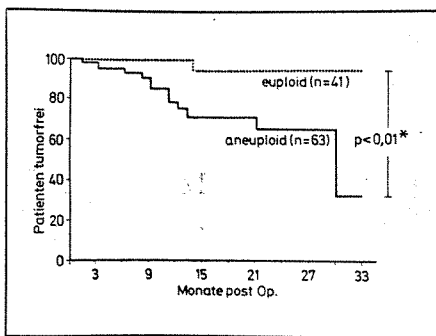


Abb. 2: Tumorrückfälle in Abhängigkeit von der Ploidie bei kurativ operierten Patienten mit kolorektalem Karzinom (n = 104). Abszisse: Zeit nach kurativer Operation (in Monaten). Ordinate: Prozentsatz tumor- bzw. rückfallfreier Patienten (Rezidive und Metastasen). * log rank-Test.

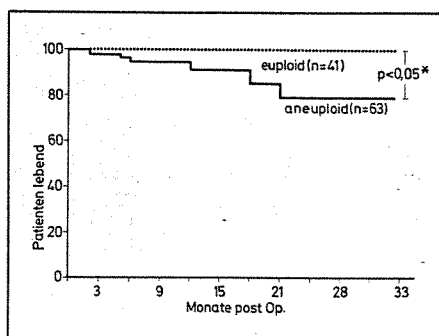


Abb. 4: Überlebende Patienten mit kolorektalem Karzinom nach kurativer Operation in Abhängigkeit von der Tumorploidie (n = 104). Abszisse: Zeit nach kurativer Operation (in Monaten). Ordinate: Lebende Patienten (in %). * log rank-Test.

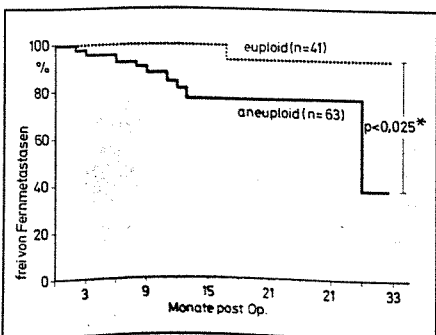


Abb. 3: Auftreten von Fernmetastasen in Abhängigkeit von der Ploidie bei kurativ operierten Patienten mit kolorektalem Karzinom (n = 104). Abszisse: Zeit nach kurativer Operation (in Monaten). Ordinate: Prozentsatz fernmetastasenfreier Patienten. * log rank-Test.

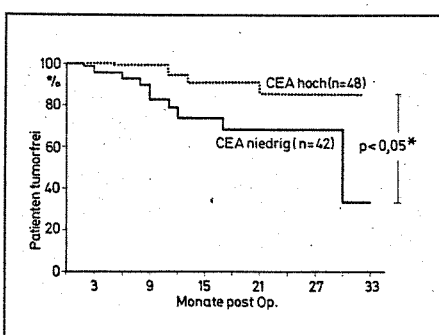


Abb. 5: Tumorrückfälle nach kurativer Operation in Abhängigkeit von der mittleren zellulären CEA-Oberflächendichte kolorektaler Karzinome (n = 90). Abszisse: Zeit nach Operation (in Monaten). Ordinate: Prozentsatz tumor- bzw. rückfallfreier Patienten. * log rank-Test.