

48. Durchflußcytometrische Untersuchungen an 30 Lungen-Carcinomen mit Hilfe automatischer Diagnoseauswertung

Flow Cytometric Investigations of 30 Patients with Lung Cancer Using Automatic Diagnostic Assessment

F. Liewald¹, G. Valet², H. Kahle², N. Demmel¹ und R. P. Wirsching¹

¹Chirurgische Universitätsklinik Großhadern, München

²Mildred Scheel Labor für Krebszellforschung, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Einleitung

Bei Lungencarcinomen finden sich gehäuft eine späte Diagnosestellung, eingeschränkte Behandlungsmöglichkeiten und ungünstige Langzeitergebnisse. Daraus ergibt sich der Wunsch, verdächtige Herde so früh wie möglich über Punktion, Bronchoskopie, Bronchiallavage oder Sputumuntersuchungen abzuklären. Die Methode der Durchflußcytometrie ermöglicht eine quantitative Analyse biochemischer und biologischer Parameter auf cellulärer Ebene und gestattet damit zusätzlich zur routinemäßigen Histopathologie neue, erweiterte Tumorklassifikationen. Mit Hilfe der elektrischen Widerstandsmessung und der Fluoreszenzbestimmung können im Durchflußcytometer bis zu 1000 Zellen pro Sekunde gleichzeitig auf ihr Zellvolumen, auf ihren DNS-Gehalt, ihren intracellulären pH-Wert und ihre Esteraseaktivität untersucht werden (1, 2). Der celluläre DNS-Gehalt ist dabei ein wesentlicher Parameter zur Differenzierung zwischen malignen und benignen Geweben. Lassen sich in den DNS-Verteilungskurven abnorme bzw. zusätzliche Gipfel nachweisen, so kann diese DNS-Aneuploidie als sicheres Zeichen für Malignität gewertet werden und auch zur automatischen Tumoranalyse verwendet werden (5). Durch die simultane cytometrische Bestimmung von cellulärer Esterasekonzentration und Zellvolumen ist eine weitere Unterscheidung benignen und malignen Gewebe möglich (1). Ziel dieser Arbeit war die biochemische und biologische Differenzierung von normalem Lungenepithel und Lungencarcinomen auf cellulärer Ebene sowie die multifaktorielle Analyse zur automatischen Diagnosestellung mit Hilfe des neuentwickelten DIAGNOS 1 Programmsystems. Darüber hinaus sollten für die Tumoren Korrelationen zwischen DNS-Ploidie, histopathologischer Klassifikationen und Prognose überprüft werden.

Material und Methode

Von 30 Patienten wurde jeweils 0,5 g Lungencarcinomgewebe und normales Lungenepithel frisch bei der Operation entnommen und

verarbeitet. Die Gewebstücke wurden separat mit einem elektrischen Gewebehacker mechanisch zerkleinert, der Gewebsbrei in HBS-Puffer suspendiert und durch engmaschige Kunststoff- und Stahlnetze gesiebt. Zur Färbung von 250 μ l Zellsuspension dienten 5 μ l eines Farbstoffcocktails aus ADB (μ , 4 diacetoxy-2,3 dicyano-Benzol) und PI (Propidiumiodid/Cyto-P-Check, Paesel, Frankfurt) zur Erfassung von intracellulärer Esteraseaktivität und cytoplasmatischem pH-Wert der lebenden Zellen sowie der DNS der toten Zellen (1, 2). Dann folgte die simultane Messung von Zellvolumen und zweier verschiedenfarbiger Fluoreszenzsignale der gefärbten Zellen mit einem Fluvo-Metricell Durchflußcytometer (3) (HEKA, Lambrecht). Dabei wurde das Volumen der hydrodynamisch focussierten Zellen über die elektrische Widerstandsänderung beim Fluß durch eine zylindrische Öffnung gemessen. Die Zellfluoreszenz wurde mit einer HBO-100 Hochdruckquecksilberdampflampe zwischen 300 - 400 nm angeregt. Die emittierte Blaufluoreszenz wurde zwischen 418 bis 440 nm und die Grünrotfluoreszenz zwischen 500 und 700 nm gemessen.

Nach elektronischer Ermittlung der maximalen Höhe der Volumen- und Fluoreszenzsignale jeder Zelle wurde der ermittelte Spannungswert mit Hilfe von Analog-Digitalwandlern mit einer Auflösung von 128 Kanälen digitalisiert und die Zahlenwerte jeder Zelle der Reihe nach auf ein Magnetband geschrieben. Vom Magnetband wurden die Meßdaten mit neuentwickelten Computerprogrammen (5) in selbstlernende Datenbank-Dateien eingebracht, so daß damit erstmals auf durchflußcytometrischem Wege automatische Diagnosen erstellt werden konnten.

Ergebnisse

Die automatische durchflußcytometrische Analyse klassifizierte von den 30 Lungencarcinomen 22 als Malignome. 4 Tumoren wurden nicht als maligne erkannt. Weitere 4 Tumoren konnten aufgrund von zu wenig Zellen in der Suspension nicht in das Computerdiagnoseprogramm aufgenommen werden. Bei den einzelnen gemessenen Zellparametern fanden sich signifikante Unterschiede zwischen normalem Lungenepithelgewebe und Lungencarcinomen (s. Tabelle 1). Mit Hilfe einer festgelegten Volumengrenze und der simultanen Markierung mit ADB und PI wurden bei der routinemäßigen Auswertung von 3-Parameter-Messungen separate Ergebnisse für größere epitheliale Zellen und kleinere inflammatorische Zellen erzielt. Dabei zeigte sich, daß das Zellvolumen der Epithel- und der Entzündungszellen im Tumor signifikant ($p < 0,05$) größer war. Weiterhin wies die Esteraseaktivität der carcinomatösen Zellen eine deutlich ($p < 0,05$) geringere Konzentration auf als die benignen Lungenepithelzellen. Die Anzahl der Entzündungszellen und der Nekroseparameter differierten ebenfalls in den Geweben ($p < 0,01$), so daß diese Parameter für eine automatische Tumordiagnostik eingesetzt wurden.

Eine DNS-Aneuploidie (abnorme, bzw. zusätzliche DNS-Gipfel, Abb. 1) konnte bei 10 der gemessenen Tumorproben festgestellt werden. Dies entsprach einer Aneuploidierate von 38 %. Die gleichzeitige Messung der Aneuploidie sowie tumorassoziierter Zelleigenschaften und deren multifaktorielle Analyse erbrachte eine automatische Tumordiagnostik in 85 % der Fälle.

Tabelle 1. Unterschiede der biologischen Parameter zwischen Lungencarcinom und gesundem Lungengewebe

	Tumor (n=26)	Normal (n=13)	p <
% Vitalzellen	31,0 \pm 2,7 ^a	47,0 \pm 3,8	0,01
Volumen der vitalen Entzündungszellen (μm^3)	585 \pm 2	473 \pm 3	0,05
Esterasekonz. d. vitalen Epithelzellen ^b	0,24 \pm 0,03	0,32 \pm 0,05	0,05
% tote bei den Entzündungszellen	67,4 \pm 3,1	52,6 \pm 4,1	0,01
% tote bei den Epithelzellen	70,7 \pm 3,8	56,1 \pm 3,9	0,05
% nackte Zellkerne	32,9 \pm 3,8	48,3 \pm 3,4	0,05

Signifikanzberechnungen nach Student-t-Test. ^aMittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts; ^bin relativen Einheiten

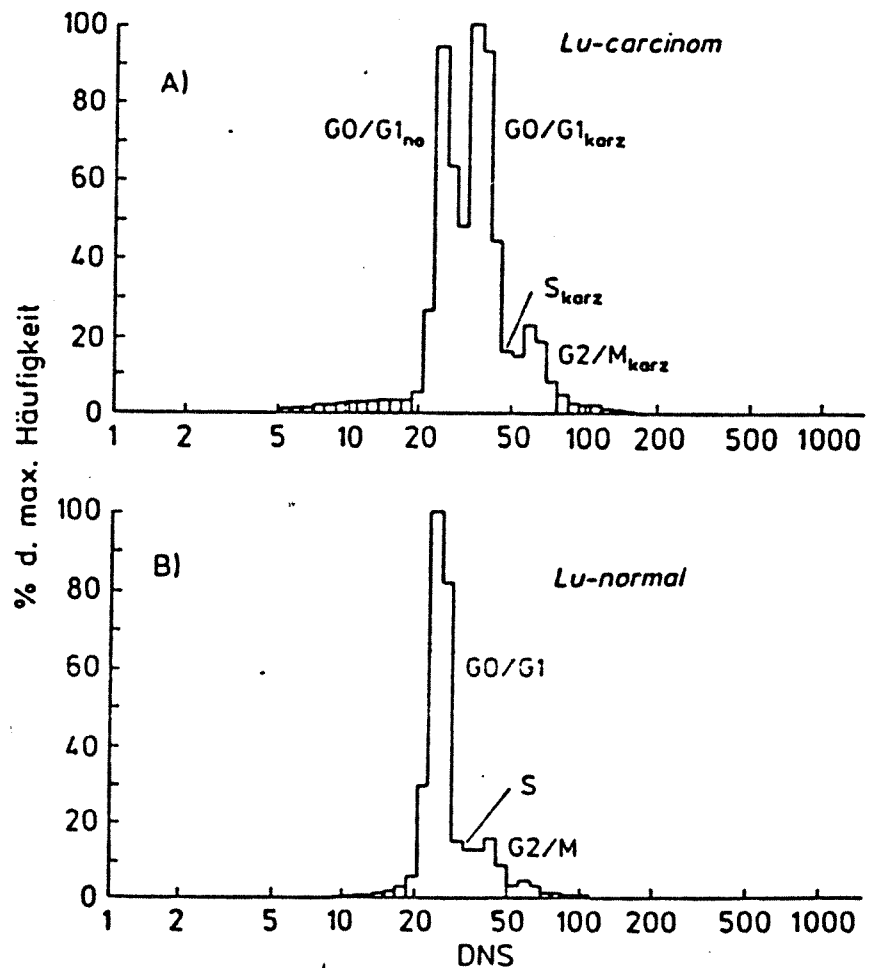


Abb. 1. DNS-Verteilungskurve von Zellen aus einem DNS-aneuploiden Lungencarcinom (A) und aus einer normalen Lunge (B). *carc* = Carcinom, *no* = normal, G_0/G_1 = Ruhezustand, S = Synthesephase, G_2/M = Prämitose und Mitosezellen

Kleinzellige Carcinome zeigten DNS-Euploidie und Aneuploidie gleich häufig. Bei Adenocarcinomen fand sich DNS-Aneuploidie in 8 von 10 Fällen. Bei den Plattenepithelcarcinomen waren 6 von 8 DNS-euploid.

Die Gegenüberstellung von DNS-Ploidie und Tumorstadium (nach UICC) ließen Korrelationen von DNS-Aneuploidie und fortgeschrittenen Tumoren erkennen. In 5 von 6 Fällen waren Tumoren im Stadium I DNS-euploid, wohingegen 5 von 5 Tumoren im Stadium IV Aneuploidie zeigten (Tabelle 2). Bei einem mittleren Beobachtungszeitraum von 8 Monaten waren von 10 Patienten mit DNS-aneuploiden Tumoren einer nach 5 Monaten tumorbedingt verstorben; alle übrigen Patienten haben bislang überlebt.

Tabelle 2. Vergleich des Patientenkollektivs nach Ploidiestatus und Tumorstadium (nach UICC)

	Stadium			
	I	II	III	IV
DNS-Euploid	5	3	4	-
DNS-Aneuploid	1	2	2	5

Zusammenfassung und Diskussion

Ein wesentliches Ziel durchflußcytometrischer Untersuchungen ist es, biochemische und biologische Informationen auf cellulärer Ebene zu erhalten, um damit eine automatische Tumordiagnose zu ermöglichen. Im einzelnen wurde mit der Mehrparameter-Durchflußcytometrie bei 30 Patienten mit operativ behandelten Lungencarcinomen im Tumorgewebe und im normalen Lungenepithelgewebe Bestimmungen der Ploidie, des Zellvolumens und der intracellulären Esteraseaktivität durchgeführt. Die Zellvolumina der Entzündungs- und Epithelzellen, die Zahl der Entzündungsstellen und der Nekroseparameter, sowie die intracelluläre Esteraseaktivität unterschieden sich signifikant in den entarteten und normalen Geweben. 38 % der Lungencarcinome wiesen DNS-Aneuploidie auf. Die simultane Bestimmung der Aneuploidie und der tumorassoziierten Zelleigenschaften und deren multifaktorielle Analyse mittels neuentwickelter selbstlernender Computerprogramme erbrachte eine automatische Tumordiagnose in 85 % der Fälle. Die Durchflußcytometrie stellt somit neben der Histomorphologie eine zusätzliche Methode dar, um in kurzer Zeit (ca. 20 min), evtl. auch schon zum Operationszeitpunkt eine Aussage über die Prognose des Tumors zu ermöglichen und erweiterte Tumorklassifikationen zu erstellen. So waren Adenocarcinome häufiger DNS-aneuploid als Plattenepithelcarcinome. Außerdem waren DNS-aneuploide Tumoren signifikant häufiger in fortgeschrittenen Tumorstadien zu finden als DNS-euploide Tumoren.

Summary and Discussion

An important intention of flow cytometric investigations is to obtain biochemical and biophysical information about cells which is suitable for automated tumor diagnosis. In this study, the ploidy status, cell volume, and intracellular esterase activity were measured in cancerous tissue compared with normal lung tissue in 30 patients who were operated on for lung cancer. Significant differences were found between normal and malignant tissue in the cell volume, the percentage of inflammatory cells, and parameters of necrosis and the intracellular esterase activity. Of the lung carcinomas, 30 % showed DNA aneuploidy. The simultaneous detection of DNA aneuploidy and tumor-associated properties in a multifactorial analysis led to correct automatic tumor diagnosis in 85 % of cases. In addition to routine histological evaluation, flow cytometry represents a further method of obtaining information about the prognosis of a tumor in a short time (20 min). DNA aneuploidy was found at a significant higher frequency in advanced tumors. Adenocarcinomas displayed DNA aneuploidy more often than squamous cell carcinomas.

Literatur

1. Valet G, Raffael A (1984) Determination of intracellular pH and esterase activity in vital cells by flow-cytometry. In: Valet G (ed) Cytostatic drug testing on patient tumor cells. Paesel, Frankfurt, S 3-21
2. Valet G, Raffael A, Moroder L, Wunsch E, Ruhenstroth-Bauer G (1981) Fast intracellular pH determination in single cells by flowcytometry. Naturwissenschaften 68:265-266
3. Kachel V, Glossner E, Kordwig E, Ruhenstroth-Bauer G (1977) Fluvo-Metricell, a combined cell volume and cell fluorescence analyzer. J Histochem Cytochem 25:804-812
4. Kachel V, Schneider H (1986) On-line three-parameter data uptake, analysis and display device for flow cytometry and other applications. Cytometry 7:25-40
5. Valet G (1987) Automated diagnosis of malignant and other abnormal cells by flow-cytometry using newly developed DIAGNOSIS 1 program system. Burger G, Ploem B (eds) Proc Int Symp Clin Cytometry and Histometry. Academic Press, London (im Druck)

Dr. F. Liewald, Chirurgische Universitätsklinik München, Klinikum Großhadern, Marchioninstr. 15, D-3000 München 70