

Durchflußcytometrische Analyse beim nicht-kleinzelligen Bronchialcarcinom und deren prognostische Bedeutung

F. Liewald^{1*}, L. Sunder-Plassmann^{1*}, G. Valet², G. Wulf², M. Weiss³ und F. W. Schildberg¹

¹ Chirurgische Klinik und Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. F. W. Schildberg) der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern,

² Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried und

³ Pathologisches Institut (em. Direktor: Prof. Dr. M. Eder) der Ludwig-Maximilians-Universität München

Schlüsselwörter: Durchflußcytometrie – nicht-kleinzelliges Bronchialcarcinom – Lymphknotenmetastasen – Rezidivtumoren – Prognose.

Key words: Non-small-cell lung carcinoma – Lymph node metastases – Tumor recurrence – Prognosis.

Die Prognose von Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialcarcinomen wird gegenwärtig meist aufgrund von Tumorstadium, histologischen Tumortyp und dem klinischen Allgemeinzustand des Patienten beurteilt. Diese Parameter berücksichtigen jedoch nicht das celluläre Verhalten und die biologische Aggressivität eines Tumors [18]. Die Durchflußcytometrie ermöglicht eine quantitative Erfassung des chromosomalen DNS-Gehaltes und somit des DNS-Ploidiestatus des Tumorgewebes. Abnormaler cellulärer DNS-Gehalt (DNS-Aneuploidie) findet sich in verschiedenen soliden Tumoren [9] und erweist sich als negativer prognostischer Faktor gegenüber Patienten mit DNS-euploiden Tumoren [19, 25, 26].

Die Bedeutung des DNS-Ploidiestatus als prognostischer Parameter bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialcarcinomen (NSCLC) sollte in dieser Arbeit mit anderen prognostischen Variablen wie histologischen Tumortyp, Tumorstadien, Grading und Operationsverfahren korreliert werden. Zu diesem Zweck wurden Primärtumor-, Lymphknotenmetastasen- und Rezidivtumorzellen durchflußcytometrisch auf ihren DNS-Gehalt untersucht.

Patienten und Methode

Patienten

Operativ entfernte Tumorproben von 112 Patienten (mittleres Alter 62 (38–84) Jahre, männlich 90, weiblich 22) mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom (NSCLC) wurden durchflußcytometrisch untersucht. Bei 70 Proben wurde an Frischzellpräparaten sofort nach der

Operation der DNS-Gehalt gemessen. Der Ploidiestatus von 13 Primärtumoren sowie deren Lokalrezidiv, welches nach einem mittleren Intervall von 21,6 Monaten operativ entfernt worden war, wurde durch Vermessung von Zellkernen ermittelt, die durch Pepsinverdauung aus paraffineingebetteten Proben herausgelöst worden waren. Um die Fallzahl derjenigen Patienten zu erhöhen, die einen N2-LK-Befall aufwiesen, und die ausschließlich kurativ und somit R₀ reseziert worden waren, wurden Zellkerne aus weiteren 29 paraffineingebetteten Proben mit Hilfe der Durchflußcytometrie vermessen. Das Tumor-Staging wurde nach den Kriterien der UICC 1987 [20] vorgenommen. 23 Pneumonektomien und 76 Lobektomien wurden im Zusammenhang mit einer mediastinalen Lymphadenektomie durchgeführt. Bei den 13 selektierten Patienten mit locoregionärem Tumorrezidiv wurde initial stets eine Lobektomie und als Reoperation stets eine Pneumonektomie vorgenommen.

Frischzellgewebe

0,25 g Frischzellgewebe wurde aus 3 verschiedenen Lokalisationen (peripher, mittelständig und zentral) des operativ entfernten Tumors entnommen, um einen repräsentativen Querschnitt zu erhalten. Zur Herstellung einer Zellsuspension wurde das Gewebe mit einem McIlwee-Gewebehacker mechanisch zerkleinert. Der Gewebepulver wurde in 5 ml HBS-Puffer suspendiert und anschließend durch ein V2A-Stahl-Sieb mit 60 µm Maschenweite gefiltert. Die Zellsuspension wurde anschließend zweimal durch 10 min Zentrifugation bei 200 × g in 50 ml HBS-Puffer gewaschen.

Fixierte Tumorproben

Die Herstellung einer Zellkernsuspension aus 29 Primärtumoren, deren N2-LK-Metastasen sowie aus 13 Primärtumoren und deren Rezidivtumoren erfolgte durch Entparaffinisierung in einer absteigenden Xylol-/Alkoholreihe und Inkubation in einer Pepsinlösung (1 mg/0,1 ml, Sigma-Chemie) nach der Methode von Hedley et al. [11].

Anschließend wurde die DNS von 250 µl Zellkernsuspension bzw. Frischzellsuspension (je ca. 10⁶ Zellen/ml) mit 5 µl Propidiumjodidlösung (2 mg/ml in HBS-Puffern, Sigma-Chemie Deisenhofen) für 15 min bei Zimmertemperatur gefärbt.

Durchflußcytometrie

Mit Hilfe eines Fluvo-Metricell Flußcytometers [12] konnte gleichzeitig die rot gefärbte Propidiumjodid-Fluoreszenz zur Bestimmung des DNS-Gehaltes sowie das Zell-/Zellkernvolumen über eine elek-

* jetzt Klinik für Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Ulm/Donau

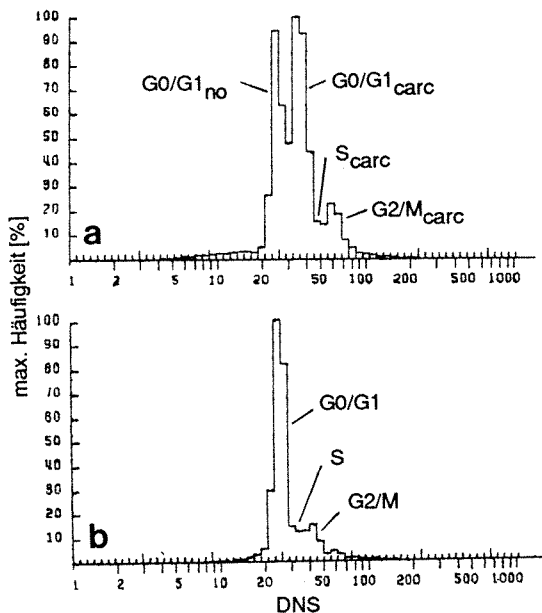


Abb. 1. a, b. Histogramm einer DNS-Verteilung bei nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom (a) und normalem Lungengewebe (b)

trische Widerstandsänderung bestimmt werden. Monodisperse Latex-Partikel mit einem Durchmesser von 5 µm (Paesel-Frankfurt) dienen als Fluoreszenz und Volumenstandard. Der Variationskoeffizient (CV = Standard Deviation/mittleres Partikelvolumen - 100 % für Partikel-Fluoreszenz und Volumen) betrug zwischen 1,8 und 2,2 %.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem DIAGNOS 1 Computerprogramm, welches eine graphische Darstellung und quantitative Auswertung der Ergebnisse erlaubt [14, 21, 22].

Die DNS-Verteilungskurve (Abb. 1) wurde automatisch links- und rechtsseitig des G0/G1-Peaks automatisch abgesucht und als DNS-aneuploid gewertet, wenn ein zweiter diskreter DNS-Gipfel entdeckt wurde, der eine Höhe von mehr als 25 % der Maximumamplitude des G0/G1-Gipfels überschreitet, und der einen DNS-Index > 1,10 aufwies. DNS-Schultern von nahezu DNS-euploiden Zellen wurden primär nicht als DNS-aneuploid gewertet; sie verursachten jedoch einen abnorm hohen Variationskoeffizienten (CV-Wert) des G0/G1-Gipfels oder eine abnorm hohe Anzahl von Zellen in dem S + G2/M Proliferationsfenster.

Als Referenzproben dienten Proben aus normalem Lungen- und tumorfreien Lymphknotengewebe.

Statistische Analyse

Nach einer mittleren Beobachtungszeit von 56 Monaten wurde der klinische Verlauf und der Überlebensstatus der Patienten aus Krankenhausakten oder durch Auskünfte des behandelnden Hausarztes erhoben. Die Überlebensanalyse erfolgte nach dem statistischen „failure-Zeit-Modell“ nach Kaplan-Meier [13].

13 selektierte Patienten mit Rezidivtumoren wurden in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier aufgrund unterschiedlicher Nachbehandlung und Patientenselektion nicht bewertet, so daß die Überlebensdaten von 99 Patienten ausgewertet wurden. Eine stufenweise Regressionsanalyse überprüfte den Einfluß bestimmter unabhängiger klinischer und pathologischer Variablen (Geschlecht, Operationsverfahren, Histologie, Tumorstadium, Differenzierungsgrad) und den Ploidiestatus des Tumors. Der Einfluß der Variablen auf die Überlebensrate wurde mit dem „proportional hazard“-Regressionsmodell nach Cox getestet.

Die Verteilung der DNS-euploiden und DNS-aneuploiden Tumoren mit den klinischen Variablen wurden nach dem Pearson χ^2 -Test mit Kontingenz-Tafeln verglichen.

Ergebnisse

Bei 49 der 112 Primärtumoren wurde ein zusätzlicher DNS-Gipfel als Ausdruck der G0/G1-Phase des Carcinoms nachgewiesen und der Tumor somit als DNS-aneuploid gewertet.

Im Tumorstadium I fanden sich überwiegend DNS-euploide Tumoren (24/33) (Tabelle 1). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl DNS-euploider Tumoren fand sich jedoch nur zwischen Tumorstadium I und III

Tabelle 1. Tumorstadium (TNM-Klassifikation, UICC 1987) und Ploidiestatus von 112 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom

TNM-Klassifikation	T1	T2	T3	N0	N1	N2	M0	M1
DNS-euploid	10	44	13	27	18	18	61	2
DNS-aneuploid	4	35	6	13	14	22	45	4
UICC-Klassifikation	I		II		III		IV	
DNS-euploid	24		15		22		2	
DNS-aneuploid	9		8		28		4	

Tabelle 2. Histopathologische Diagnose und Ploidiestatus von 112 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom

	Platten-epithel	Adenoca.	Großzell.	gesamt
DNS-euploid	31	25	7	63
DNS-aneuploid	24	20	5	49
gesamt	55	45	12	112

Tabelle 3. Tumorgrading und DNS-Ploidiestatus von 112 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom

	Differenzierungsgrad			gesamt
	I	II	III	
DNS-euploid	7	34	33	63
DNS-aneuploid	5	25	19	49
gesamt	12	59	41	112

Tabelle 4. Ploidie- und Überlebensstatus von 99 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom (13 Patienten mit Rezidivtumoren und Reoperation wurden nicht berücksichtigt)

Stadium	DNS-Ploidiestatus	Zahl d. Pat. (gesamt)	Zahl d. Pat. (verstorben)	Zahl d. Pat. (lebend)
I	DNS-euploid	17	–	17
	DNS-aneuploid	8	5	3
II	DNS-euploid	10	3	7
	DNS-aneuploid	8	8	–
III	DNS-euploid	22	15	7
	DNS-aneuploid	28	26	2
IV	DNS-euploid	2	2	–
	DNS-aneuploid	4	4	–
gesamt	DNS-euploid	51	20	31
	DNS-aneuploid	48	43	5

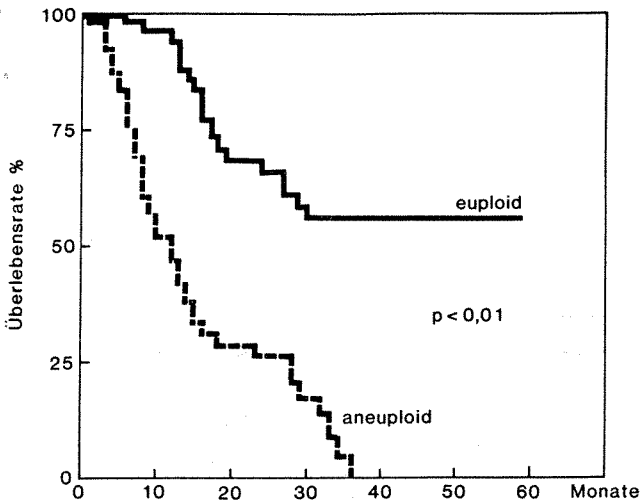


Abb. 2. DNS-Ploidiestatus und kumulative Überlebensrate (Kaplan-Meier) bei 99 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom. (DNS-euploid $n = 51$, DNS-aneuploid $n = 48$)

($p < 0,01$). Der DNS-Ploidie-Status war unabhängig vom histologischen Tumortyp. DNS-Aneuploidie zeigte sich bei 24/55 der Plattenepithelcarcinome, bei 20/45 der Adenocarcinome und 5 der 12 Fälle mit großzelligen Carcinomen (Tabelle 2).

Keine Korrelation konnte zwischen Tumorgrading und DNS-Ploidiestatus nachgewiesen werden (Tabelle 3). Somit handelte es sich bei dem DNS-Ploidiestatus um eine unabhängige Variable.

63 der 99 Patienten starben nach einem Beobachtungszeitraum von 56 Monaten (Tabelle 4). Patienten mit DNS-aneuploiden Tumoren wiesen eine signifikant schlechtere Überlebenszeit auf als Patienten mit DNS-euploiden Tumoren. So betrug die mediane Überlebenszeit

für Patienten mit DNS-aneuploiden Tumoren 12,1 Monate gegenüber 33,8 Monaten bei Patienten mit DNS-euploiden Tumoren ($p < 0,01$). 87,5% der Patienten mit DNS-aneuploiden Tumoren verstarben im Beobachtungsintervall, gegenüber nur 39,2% mit DNS-euploiden Tumoren ($p < 0,001$) (Abb. 2, Tabelle 4). Diese prognostische Bedeutung des Ploidiestatus war unabhängig vom Tumorstadium. In allen Tumorstadien überlebten Patienten mit DNS-euploiden Tumoren signifikant länger (Abb. 3, Tabelle 5).

29 Primärtumoren und ihre korrespondierenden tumorinfiltrierten N2-Lymphknotenmetastasen wurden aus fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben auf ihren DNS-Gehalt hin untersucht. Im Primärtumor (PTU) war das Verhältnis DNS-Euploidie/DNS-Aneuploidie 18/11, in der Lymphknotenmetastase (LM) hingegen 25/4. Bei 7 Patienten unterschieden sich somit der DNS-Ploidiestatus im Primärtumor und in der Lymphknotenmetastase in der Weise, daß der PTU stets DNS-aneuploid war und die LM stets DNS-euploid. Die beste Überlebensprognose wiesen die Patienten mit DNS-euploidem PTU und DNS-euploider LM auf (mediane Überlebenszeit: 17,0 Monate), gefolgt von Patienten mit DNS-aneuploidem PTU und DNS-euploider LM (MÜZ: 9,0 Monate). Die schlechteste Prognose zeigten Patienten mit DNS-aneuploidem PTU und DNS-aneuploider LM (MÜZ: 5,0 Monate) (Abb. 4).

Mit Hilfe der multivariaten Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, daß die Überlebensprognose überwiegend von den ungebundenen variablen Tumorstadien und DNS-Ploidiestatus abhängen und der Differenzierungsgrad, histologischer Tumortyp und das Operationsverfahren keine prognostische Aussage erlaubt (Tabelle 6).

Von 13 Patienten, die an Rezidivtumoren operiert worden waren, wies nur 1 Patient einen DNS-aneuploiden Tumor auf. Alle Rezidivtumoren behielten den DNS-

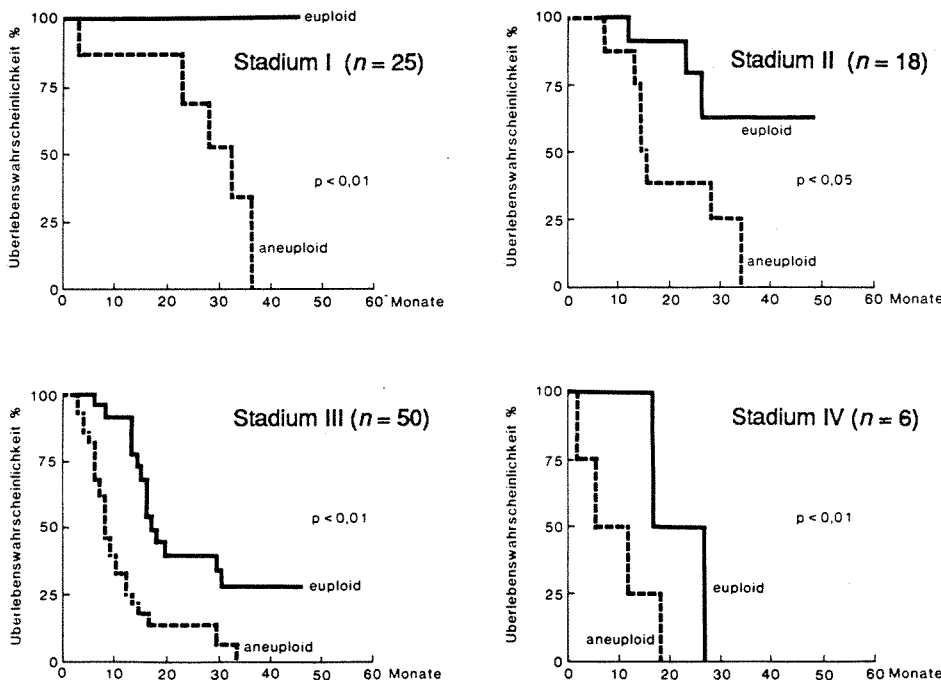


Abb. 3. DNS-Ploidiestatus und kumulative Überlebensrate (Kaplan-Meier) bei 99 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom im Tumorstadium I-IV (UICC 1987). DNS-euploid/DNS-aneuploid: Stad. I (17/8), Stad. II (10/8), Stad. III (22/28), Stad. IV (2/4)

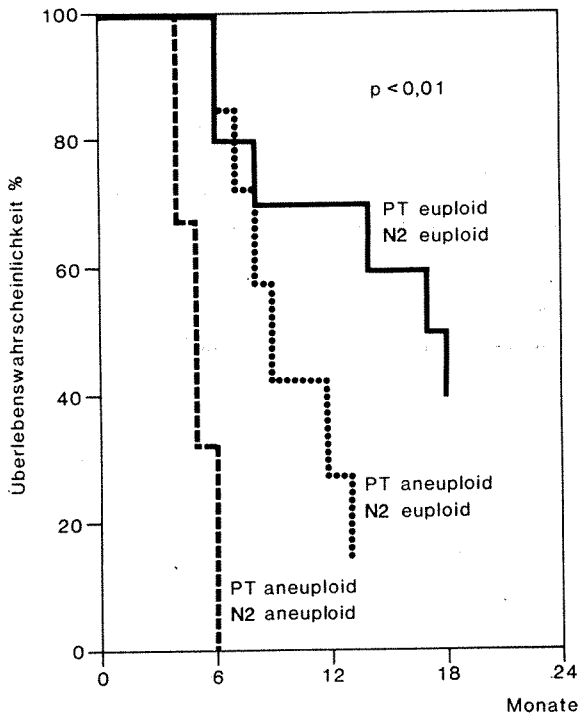


Abb. 4. DNS-Ploidiestatus und kumulative Überlebensrate (Kaplan-Meier) bei 29 Patienten im Stadium III mit N2-Lymphknotenbefall (PT = Primärtumor; N2 = mediastinaler LK-Befall). PT DNS-euploid, N2 DNS-euploid, $n = 18$; PT DNS aneuploid, N2 DNS euploid, $n = 7$; PT DNS-aneuploid, N2 DNS-aneuploid, $n = 4$

Ploidiestatus des Primärtumors über einen Beobachtungszeitraum von 4 bis 62 Monaten bei. Auch die Form der DNS-Verteilungskurve blieb konstant.

Diskussion

Der DNS-Ploidiestatus von Primärtumor, Lymphknotenmetastase und Rezidivtumor wurde bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom untersucht, um neben dem histologischen Tumortyp und Tumorausbreitungsstadium zusätzliche prognostische Parameter auf zellulärer Ebene zu definieren.

43% der untersuchten Bronchialcarcinome wiesen eine DNS-Aneuploidie auf. Frühere Studien [3, 4, 10, 23, 26] zeigten bei 45-80% der Patienten ein DNS-aneuploides Tumorgewebe. Zimmermann et al. [26] begründete ihre Ergebnisse mit einer niedrigeren Aneuploidierate mit der Tatsache, daß in fortgeschritteneren Tumorstadien vermehrt DNS-aneuploide Zellen auftreten. Weitere Ursachen einer unterschiedlich hohen Aneuploidierate liegen in der Zell- bzw. Zellkernpräparation, der simultanen Zusatzmessung anderer biochemischer Zelleigenschaften und in der Art der Auswertung der DNS-Verteilungen. Die höchsten DNS-Aneuploidieraten werden nach Pepsinverdauung der Zellen und Präparation der nackten Zellkerne erreicht; die niedrigsten bei Zusatzmessung weiterer biochemischer und biologischer Zellparameter an vitalen Zellen, was die bessere Zellcharakterisierung von Lungencarcinomen ermöglicht [14]. Außerdem wurden bei der Auswertung nur solche Tumorzellproben als

DNS-aneuploid bezeichnet, die einen DNS-Index von $> 1,10$ aufwiesen d. h. durch einen manifesten Zusatzgipfel in der DNS-Verteilung identifizierbar waren. Durch diese Auswertung fand sich DNS-Aneuploidie in keinem der Fälle bei normalem Lungengewebe.

In unserer Untersuchung konnte gezeigt werden, daß Patienten mit DNS-euploiden Tumoren eine signifikant ($p < 0,01$) bessere Überlebenswahrscheinlichkeit aufwiesen als Patienten mit DNS-aneuploiden Bronchialcarcinomen (Abb. 2). Diese prognostische Bewertung durch den Ploidiestatus war als unabhängige Variable in allen Tumorstadien zu finden. DNS-Bestimmungen an anderen soliden Tumoren wie bei Colon- und Mammacarcinomen bestätigen den Einfluß des Ploidiestatus auf die Überlebensprognose. In einer Multivariananalyse nach Cox [7] zeigte sich der Ploidiestatus dabei als unabhängige Variable, dessen prognostische Bedeutung der Bewertung durch das Tumorstadium gleichkam (Tabelle 6). Histologischer Tumortyp, Differenzierungsgrad und Operationsverfahren erwiesen sich ohne Einfluß auf die Prognose. Die Patientenselektion der überwiegend weiblichen Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien könnte Ursache für die negative prognostische Bewertung des weiblichen Geschlechtes sein.

Der Prozeß der Metastasierung in Lymphknoten bewirkte bei 7/29 Patienten (24%) eine Veränderung des DNS-Ploidiestatus. Auffallend ist hierbei stets die DNS-Aneuploidie im Primärtumor bei DNS-Euploidie der Lymphknotenmetastase. Dies könnte Folge der größeren Heterogenität im Primärtumor und nach Volm et al. [24] ein Ausdruck der Fähigkeit des Primärtumors zur Metastasierung sein. Da Patienten mit DNS-euploiden PTU und LM signifikant länger überlebten als Patienten mit DNS-aneuploidem PTU und DNS-euploider LM gefolgt

Tabelle 5. Mediane Überlebensrate [Monate] von 99 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom in Abhängigkeit des Ploidiestatus (13 Patienten mit Rezidivtumor und Reoperation wurden nicht berücksichtigt)

Stadium	DNS-euploid	DNS-aneuploid	Log rank-test $p <$
I	alle lebend	22,5	0,01
II	> 36	14,5	0,05
III	16,5	8,0	0,01
IV	22,0	8,5	0,01

Tabelle 6. Regressionsmodell nach Cox [7] Korrelation zwischen klinischen und histologischen Variablen (einschließlich des Ploidiestatus) zur Überlebensrate. s. = signifikant, n.s. = nicht signifikant, SE = Standardfehler, p = Signifikanzniveau

Variable	Regressionskoeffizient	SE	p -Wert $<$	
DNS-Ploidiestatus	1,69	0,30	0,001	s.
Tumorstadium	1,22	0,24	0,001	s.
Geschlecht	0,91	0,40	0,01	s.
Histologie	0,19	0,23	0,29	n.s.
Differenzierungsgrad	0,20	0,22	0,35	n.s.
Operationsverfahren	0,28	0,34	0,68	n.s.

von Patienten mit DNS-aneuploidem PTU und LM erscheint die gleichzeitige Untersuchung des PTU und der LM auf ihren DNS-Gehalt eine Voraussetzung, um eine möglichst exakte Aussage zur Prognose treffen zu können.

Während auf dem Wege zur LK-Metastase eine DNS-Instabilität mit Veränderung des DNS-Ploidiestatus möglich zu sein scheint, blieb der Ploidiestatus beim Lokalrezidiv stets unverändert. Im Gegensatz zu Arbeiten von Asamura et al. [1] fanden sich bei unseren Ergebnissen überwiegend (12/13) DNS-euploide DNS-Verhältnisse im Primär- und Rezidivtumor. Vorstellbar wäre, daß DNS-euploide Tumoren daher aufgrund ihrer geringeren biologischen Aggressivität eher zum Lokalrezidiv neigen, wohingegen Patienten mit DNS-aneuploiden Tumoren vorzeitig an Metastasen versterben könnten.

Ein wichtiges Problem in der Ploidiebestimmung wird durch die Heterogenität des Tumors bestimmt [16]. Unterschiede in der DNS-Bewertung, sowohl im Primärtumor wie auch in der Lymphknotenmetastase [2, 8, 9, 17], könnten dadurch vermindert werden, daß aus verschiedenen Lokalisationen des Tumors Gewebe entnommen wird und dadurch ein repräsentativer Querschnitt erreicht wird. Einmalige endoskopische Biopsien, Bürstenabstriche und Feinnadelpunktionen führen zu falsch-negativen Resultaten [5, 6], so daß nur eine repräsentative Tumormenge (mindestens 0,25 g Gewebe) aus zentraler, mittelständiger und peripherer Region eine exakte DNS-Ploidiebestimmung erlaubt.

Die prognostische Bedeutung des Ploidiestatus könnte somit zu einer erweiterten Tumorklassifikation führen. Von klinischer Bedeutung könnte dies bei Patienten im Tumorstadium III mit N2-LK-Befall sein. Martini et al. [15] therapierte Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom und fortgeschrittenem N2-LK-Befall mit einer präoperativen Chemotherapie und einer anschließenden operativen Tumoresektion. Sowohl Resektionsrate wie auch Überlebensrate konnten durch die präoperative Chemotherapie gesteigert werden. Als Selektionskriterien dienten radiologische und endoskopische Maßnahmen wie CT, Bronchoskopie und Röntgen-Thoraxuntersuchungen, wonach ausschließlich Patienten mit „N2 bulky disease“ und einer aufgeweiteten Carina eine präoperative Chemotherapie erhielten. Vorstellbar sind auch Selektionskriterien auf cellulärer Ebene, die eine Chemotherapie bei fortgeschrittenen Stadien nicht-kleinzelliger Bronchialcarcinome rechtfertigt. Hierzu überprüfen wir z. Zt. den Einfluß des Ploidiestatus auf das Ansprechen einer Chemotherapie bei Stadium-III-Patienten mit N2-LK-Befall.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Bestimmung des Ploidiestatus im PTU und in der LM ein wichtiger unabhängiger prognostischer Faktor darstellt, der für eine erweiterte Tumorklassifikation geeignet wäre.

Zusammenfassung. Neben der Histologie, Tumor- und Lymphknoteninfiltration ermöglicht die Bestimmung des DNS-Ploidiestatus zusätzliche prognostische Informationen. Operationspräparate von 112 Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialcarcinomen wurden durchflußcytometrisch untersucht. DNS-Aneuploidie fand sich bei

43% der Primärtumoren. Unabhängig vom Tumorstadium lebten Patienten mit DNS-euploiden Tumoren signifikant länger ($p < 0,01$) als Patienten mit DNS-aneuploiden Carcinomen. Bei 29 Fällen wurde der DNS-Ploidiestatus des Primärtumors (PTU) mit demjenigen der N2-Lymphknotenmetastase (LM) verglichen, wobei bei 7 Proben eine Veränderung von DNS aneuploidem PTU zur DNS-euploiden LM nachgewiesen wurde. Patienten mit DNS-euploidem PTU und DNS-euploider LM lebten signifikant länger als Patienten mit DNS-aneuploidem PTU und DNS-euploider LM, gefolgt von Patienten mit DNS-aneuploidem PTU und LM. Bei tumorösem Lymphknotenbefall ermöglicht nur die gleichzeitige Bestimmung des DNS-Ploidiestatus des PTU und der LM eine exakte prognostische Bewertung. Im Falle des loco-regionären Rezidivs blieb der Ploidiestatus stets unverändert und war in 12 von 13 Tumoren DNS-euploid. Somit ergibt die Bestimmung des DNS-Ploidiestatus prognostische Information, die für eine erweiterte Tumorklassifikation verwendet werden kann.

Summary. Tumor- and lymphnode infiltration, and the DNA-ploidy status of a tumor contain prognostic information in addition to the information obtained by histological examination of surgical samples. Specimens from 112 patients with non-small-cell lung carcinoma obtained immediately after surgery were investigated by means of flow cytometry. DNA-aneuploidy was found in 43% of the primary tumors. Independent from tumor stage, patients with DNA-euploid tumors lived significantly longer ($p < 0.01$) than with DNA-aneuploid carcinomas. In 29 cases the DNA-ploidy status of the primary tumor (PTU) could be compared with that of the N2 lymphnode metastases (LM). 7 samples revealed a change from DNA-aneuploidy in the PTU to DNA-euploidy in the LM. Patients with DNA-euploid PTU and DNA-euploid LM lived significantly longer than patients with DNA-aneuploid PTU/DNA-aneuploid LM, and patients with DNA-aneuploid PTU/DNA-aneuploid LM. In case of lymphnode infiltration only the simultaneous measurement of DNA-ploidy of PTU and LM offers an accurate prognostic evaluation. Local tumor recurrence exhibited stability of DNA-ploidy, showing DNA-euploidy in 12 out of 13 PTU and their corresponding recurrent tumor. Thus, the DNA-ploidy status offers additional prognostic informations which is useful for an extended tumor classification.

Literatur

1. Asamura, H., Nakajima, T., Mukai, K., Shimosato, Y. (1989) Nuclear DNA content by cytofluorometry of stage I adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative recurrence. *Chest* 96: 312
2. Auer, G. U., Fallenius, A. G., Erhardt, K. Y., Sundelin, B. S. B. (1984) Progression of mammary adenocarcinomas as reflected by nuclear DNA content. *Cytometry* 5: 420
3. Blondal, T., Lindgren, A. (1982) Fluorescence cytophotometric measurements of nuclear DNA in adenocarcinoma of the lung: Relation of proliferative activity and DNA ploidy to prognosis. *Anal. Quant. Cytol.* 3: 225

4. Blondal, T., Bengsson, A. (1981) Nuclear DNA measurements in squamous carcinoma of the lung: A guide for prognostic evaluation. *Anticancer Res. 1*: 79
5. Bunn, P., Carney, D., Gazdar, A., Whang-Peng, J., Matthews, M. (1983) Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. *Cancer Res. 43*: 5026
6. Chassevent, A., Berruchon, I., Bertrand, G., Chretien, M. F., Tuchsais, C., George, P., Larra, F., Rebel, A., Oury, M. (1986) Flow DNA analysis in human lung cancer: Potentiality and limitations due to sampling methods. *Biol. Cell 58*: 121
7. Cox, D. R. (1972) Regression models and life tables. *J. R. Statist. Soc. B 34*: 187
8. Feichter, G., Goertler, K. (1984) Impulszytometrische Beurteilung der Tumorkinetik von Primärtumoren und zugehörigen Metastasen. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 68*: 168
9. Frankfurt, O. S., Slocum, H. K., Rustum, Y. M., Arbuck, S. G., Pavelic, Z. P., Petrelli, N., Huben, R. P., Pontes, E. J., Greco, W. R. (1984) Flow cytometric analysis of DNA-aneuploidy in primary and metastatic human solid tumors. *Cytometry 5*: 71
10. Friedlander, M. L., Hedley, D. W., Taylor, I. W. (1984) Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. *J. Clin. Pathol. 37*: 961
11. Hedley, D. W., Friedlander, M. L., Taylor, I. W., Rugg, C. A., Musgrove, E. A. (1983) Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem. 31*: 1333
12. Kachel, V., Glossner, E., Kordwid, E., Ruhenstroth-Bauer, E. (1977) Fluvo-metricell, a combined cell volume and cell fluorescence analyser. *J. Histochem. Cytochem. 25*: 804
13. Kaplan, E. L., Meier, P. (1958) Non-parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Statistical Assoc. 53*: 457
14. Liewald, F., Demmel, N., Wirsching, R., Kahle, H., Valet, G. (1990) Intracellular pH, esterase activity, and DNA measurements of human lung carcinomas by flow cytometry. *Cytometry 11*: 341
15. Martini, N., Kris, M. G., Gralla, R. J., Bains, M. S., Mc Cormack, P. M., Kaiser, L. R., Burt, M. E., Zaman, M. B. (1988) The effects of preoperative chemotherapy on the resectability of non-small cell lung carcinoma with mediastinal lymph node metastases (N2 M0). *Ann. Thorac. Surg. 45*: 370
16. Müller, K.-M., Fisseler-Eckhoff, A. (1989) What's new in lung tumor heterogeneity? *Pathol. Res. Pract. 184*: 108
17. Olszewsky, W., Darzynkiewicz, Z., Rosen, P. P., Claps, M. L., Melamed, M. R. (1982) Flow cytometry of breast carcinoma; possible altered kinetics in axillary lymph node metastases. *Anal. Quant. Cytol. 4*: 275
18. Rübe, Ch., Valet, G., Eder, M. (1988) Cellular DNA content and metastasis pattern in colorectal carcinomas. *Virchows Arch. [A] 413*: 419
19. Tribukait, B. (1986) Diagnostic and prognostic significance of modal DNA values and prognosis of S-phase cells in human carcinoma of the bladder. In: *Quantitative image analysis in cancer cytology and histology*. Hrsg.: J. Y. Mary, J. P. Rigont; Elsevier, Amsterdam, S. 315
20. UICC (1987) TNM classification of malignant tumors. Hrsg.: P. Hermanek, L. H. Sobin; Springer, Berlin Heidelberg New York, 4. Aufl.
21. Valet, G., Kahle, H., Wirsching, R., Liewald, F., Demmel, N., Rübe, Ch., Warnecke, H. H. (1987) Automatische Identifizierung und biochemische Charakterisierung menschlicher Tumorzellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie. In: *Endokrine aktive maligne Tumoren*. Hrsg.: D. Engelhardt, K. Mann; Springer, Berlin Heidelberg New York
22. Valet, G. (1987) Automated diagnosis of malignant and other abnormal cells by flow cytometry using newly developed DIAGNOS 1 program system. In: *Proceedings of the international symposium on cytometry and histometry*. Hrsg.: G. Burger, B. Ploem, K. Goertler; Academic Press, London
23. Volm, M., Drings, P., Mattern, J., Sonka, J., Vogt-Moykopf, I., Wayss, K. (1985) Prognostic significance of DNA patterns and resistance-predictive tests in non-small cell lung carcinoma. *Cancer 56*: 1396
24. Volm, M., Mattern, J., Vogt-Schaden, M., Wayss, K. (1987) Flow cytometric analysis of primary lung carcinomas and their lymph node metastases. *Anticancer Res. 7*: 71
25. Wirsching, R., Lamerz, R., Wiebecke, B., Liewald, F. (1987) Flow cytometric evaluation of colorectal carcinoma as completion of conventional tumor examination. *J. Exp. Clin. Cancer Res. 6*: 117
26. Zimmerman, P. V., Hawson, G. A. T., Bint, M. H., Parsons, P. G. (1987) Ploidy as a prognostic determinant in surgically treated lung cancer. *Lancet II*: 530

Dr. F. Liewald
 Klinik für Thorax- und Gefäßchirurgie
 der Universität
 Steinhövelstraße 9
 W-7900 Ulm/Donau
 Bundesrepublik Deutschland