

Cytokinetic analysis of lung cancer

Citation for published version (APA):

Tinnemans, M. M. F. J. (1996). *Cytokinetic analysis of lung cancer*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1996

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary and general discussion

This thesis describes the evaluation of tumor growth parameters in lung cancer and the development of more refined methods to measure cell proliferation and cell death. *Part I* comprises the clinical studies that have been performed on bronchoscopy specimens of in vivo BrdU labeled lung cancer patients. In *Part II*, several pitfalls that arose from these clinical studies are addressed.

Chapter 2 describes the bivariate BrdU/DNA flow cytometric analysis of a series of lung cancer biopsy specimens. The method allowed to obtain dynamic cytokinetic data after in vivo labeling with BrdU in a majority of cases. A difference in proliferation parameter scores between the group of patients with small cell lung cancer (SCLC) and the group of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) was expected, since SCLC and NSCLC are known to display different clinical behavior and growth rate. However, when the average scores for BrdU labeling index (LI), S-phase transit time (T_s) and potential tumor doubling time (T_{pot}) of the two cancer types were compared, no significant differences were observed. Therefore, the slower growth rate of tumors of the NSCLC type is probably due to a higher rate of cell loss than is the case in tumors of the SCLC type. Loss of cells from a tumor can occur via two different pathways, i.e. necrosis and apoptosis. Evidence exists that apoptosis or programmed cell death plays an important role in tumor growth. In all lung cancer samples, cells with an S-phase DNA content were detected, which had not incorporated BrdU. The origin of these cells, as well as their fate was not clear, but we suggest that their occurrence might be related to (programmed) cell death. In **chapter 6**, we elaborate on this subject.

The series of bronchial biopsies that was described in **chapter 2** was extended with an additional series of 57 cases in order to evaluate the prognostic value of the cytokinetic parameters (**chapter 3**). These parameters of in total 92 cases were related to the patient survival time. The T_{pot} was found to be a significant indicator of prognosis in NSCLC. In particular, a short T_{pot} and short T_s significantly predicted for a shorter survival period in non-squamous NSCLC. Therefore, the determination of T_{pot} and T_s of individual bronchial biopsies may in future be useful for the design of more adequate treatment schedules in lung cancer. The correlation of a high LI with short survival time in non-squamous NSCLC was borderline significant. This may be due to the admixture of non-tumor cells in the samples used for flow cytometry. To correct for these non-malignant cells, two approaches have been pursued, i.e. 1) immunohistochemical estimation of the BrdU LI in tissue sections, thus combining morphological information and cell proliferation parameters, and 2) the flow cytometric selection of cancer cells on basis of their cytokeratin expression. The fact that non-malignant cells bias the outcome of flow cytometric analysis became apparent from the comparison of BrdU labeling indices in tumor cell suspensions and tissue sections, since a higher

BrdU LI was measured when tumor cells could be identified on basis of morphology (**chapter 4**).

Since in recent years, the expression of the proliferation associated markers PCNA and Ki67-antigen has been used to measure proliferation, we compared the BrdU LI to the scores of these markers in tissue sections (**chapter 4**). These two intrinsic markers were chosen because PCNA expression is thought to identify the S-phase compartment, while Ki67-antigen is supposed to reflect the growth fraction. Controversial reports exist on the reliability of these parameters, since their detectability seems to depend on the fixation and staining methods applied. We conclude that the scores of PCNA and Ki67-antigen, immunohistochemically detected in ethanol fixed, paraffin embedded tissue sections reflect functional proliferative activity, comparable to the in vivo BrdU labeling index. It is therefore suggested that these two markers provide valuable information about the proliferative capacity of a malignancy, but do not reflect its dynamic properties (i.e. T_s , T_{pot}). For this purpose, the feasibility of multiparameter flow cytometric analysis was evaluated (**chapter 5**).

A three color flow cytometric assay was developed for discriminating between diploid non-epithelial cells and (diploid) tumor cells, based on the simultaneous detection of cytokeratin, DNA and a proliferation associated marker, such as PCNA, Ki67-antigen or BrdU. By gating on cytokeratin positivity, epithelial cancer cells can be selected for a detailed cell cycle analysis. This method appeared to be applicable to cell suspensions obtained from frozen tissue blocks, which makes it useful for multicentre clinical studies. Furthermore, recent studies have shown that cytokeratin selection is also feasible in formalin fixed, paraffin embedded tissue (Leers et al., unpublished data). We therefore suggest to apply such a selection procedure in future studies determining the prognostic value of flow cytometry derived parameters.

In reference to the observation of non-BrdU labeled cells with S-phase DNA content, that was described in **chapter 2**, a series of experiments was carried out to investigate the origin and fate of this cell population (**chapter 6**). The most likely explanation for the occurrence of these cells seems to be cell cycle arrest in S-phase, rather than inadequate diffusion of BrdU throughout the tissue. The possibility that tumor cells, being arrested in the cell cycle under suboptimal conditions, can regain their cycling capacity when the growth restriction is released, is of clinical and therapeutic importance. Therefore, we addressed the question whether the observed cell cycle arrest in nutrient deprived cell cultures is reversible. We conclude that cells arrested in S-phase because of unfavourable growth conditions can regain their cycling capacity upon nutrient suppletion, depending on the duration of cell arrest. Cells with an S-phase DNA content that were unable to incorporate BrdU and had evidently resided in S-phase for a longer period of time, appeared to be irreversibly arrested, eventually resulting in cell death.

In **chapter 7** we aimed at the development of a valid detection method for cell death by discriminating between vital, necrotic and apoptotic cells. Detection of DNA nicks

allowed the distinction between vital cells on the one hand and necrotic and apoptotic cells on the other hand. Since changes in nuclear organization and in membrane structure suggest a role of the nuclear matrix and the cytoskeleton, these two cellular compartments were studied in relation to cell death. In contrast to necrotic cells, apoptotic cells still display specific components of the nuclear matrix and in early apoptosis, cytoskeletal filaments remain present in the cell. We conclude that, based on the differences that apoptotic and necrotic cells display in their cytoskeleton, nuclear matrix and nuclear DNA, immunostaining combined with *in situ* nick translation in a multiparameter flow cytometric assay can discriminate between vital, necrotic and apoptotic cells.

Tumor growth is the net result of cell formation and cell loss. Many clinicians attribute a fast growth rate to a high proliferation rate, and the efficacy of anticancer agents to antiproliferation. Our results in lung cancer and other recent data challenge these paradigms. The rate of cell loss is a major determinant of clinical growth rate and the chemosensitivity of cancer cells is at least in part dependent on the capacity to enter the apoptotic pathways. The exact quantitation of proliferation and apoptosis is therefore needed to predict the growth potential and chemosensitivity of individual cancers.

Samenvatting

Ondanks betere behandelingsmethoden voor longkanker is deze ziekte in de westerse landen nog steeds de belangrijkste doodsoorzaak ten gevolge van maligniteiten. De laatste jaren is bij mannen een daling waargenomen in het aantal longkankersterftes, terwijl bij vrouwen dit aantal blijft stijgen.

Het overgrote deel van de longtumoren wordt op basis van hun histologie ingedeeld in vier hoofdgroepen, te weten plaveiselcelcarcinoom, adenocarcinoom, grootcellig ongedifferentieerd carcinoom en kleincellig carcinoom. De eerste drie typen worden ook wel samen niet-kleincellige longcarcinomen genoemd. Patienten met een niet-kleincellig longcarcinoom hebben over het algemeen betere overlevingskansen dan patienten met een kleincellige aandoening, hetgeen voor een deel te verklaren is door het agressieve groeigedrag van de kleincellige longtumoren.

Groei van weefsels wordt bepaald door de balans tussen celaanmaak (proliferatie) en celverlies (celdood). Om de groei van een tumor te kunnen voorspellen, en eventueel te beïnvloeden, is het nodig de mate van celproliferatie en celdood te kunnen meten. Dit proefschrift beschrijft de evaluatie en verfijning van een aantal meetmethoden voor tumorgroei. Het gebruikte materiaal is afkomstig van longkankerpatienten die bromodeoxyuridine (BrdU) toegediend kregen. We noemen dit *in vivo labeling*. BrdU is een synthetische stof die in plaats van thymidine in het DNA wordt ingebouwd tijdens de DNA synthese-fase (S-fase) van de celcyclus. Enkele uren na de *in vivo* labeling met BrdU wordt een biopt genomen door middel van bronchoscopie. Vervolgens wordt in de cellen, die uit het biopt geïsoleerd worden, de mate van BrdU inbouw en de DNA inhoud bepaald door middel van flowcytometrie. Op basis van deze gegevens kunnen o.a. de snelheid waarmee individuele cellen delen en de potentiële verdubbelingstijd van de tumor worden berekend. Deze laatste factor is een maat voor de tijd die nodig is om het dubbele aantal cellen te verkrijgen wanneer er geen rekening wordt gehouden met het optreden van celdood.

In de hoofdstukken 2 t/m 5 van dit proefschrift worden celdelingsstudies in tumormateriaal beschreven. Het feit dat in de kliniek wordt waargenomen dat niet-kleincellige longtumoren veel langzamer groeien dan kleincellige doet een snellere proliferatie vermoeden in het laatste tumortype. Er werd echter geen noemenswaardig verschil gevonden tussen de berekende proliferatiewaarden van niet-kleincellige en kleincellige longtumoren. Waarschijnlijk is het minder agressieve groeigedrag van niet-kleincellige tumoren te verklaren door een veel groter celverlies vergeleken met kleincellige tumoren.

Een bepaalde groep cellen, die veelvuldig werd geobserveerd in het patiëntenmateriaal van zowel kleincellige als niet-kleincellige tumoren, bevond zich in de S-fase maar bouwde geen BrdU in (de zgn. *ongelabelde S-fase cellen*). Het vermoeden bestaat dat

deze cellen een rol spelen bij het tumorcelverlies. In hoofdstuk 6 van dit proefschrift wordt hier verder op ingegaan.

De gegevens omtrent de celdelingsactiviteit werden gekoppeld aan de overlevingsduur van de patiënten, om zodoende te onderzoeken of het verloop van de ziekte voorspeld kan worden aan de hand van informatie uit een klein stukje tumorweefsel. In niet-kleincellige longcarcinomen bleek met name een korte potentiële verdubbelingstijd verband te houden met een kortere overlevingsduur. In plaveiselcelcarcinomen was bovendien ook een korte S-fase duur gecorreleerd met een slechtere prognose. Het bepalen van de celdelingsactiviteit in een biopt kan daarom van nut zijn bij de beslissingen omtrent specifieke behandelingsmethoden.

Bij de analyse van de tumorbiopten werden we geconfronteerd met een aantal methodologische problemen. Zo veroorzaken bijvoorbeeld de over het algemeen wisselende hoeveelheden niet-tumorcellen die aanwezig zijn in het bioptmateriaal een onderschatting van de groeipotentie van de tumor. Door het gebruik van weefselcoupes, waarin tumor- en niet-tumorcellen microscopisch onderscheiden kunnen worden, kan dit probleem deels ondervangen worden. Door toepassing van antistoffen tegen celdelingsmerkers kan in deze coupes de proliferatie-activiteit van alleen de kankercellen bepaald worden. Met deze methode kunnen echter veel minder cellen worden geanalyseerd in vergelijking met flowcytometrie. Verder wordt uit weefselcoupes alleen "statische" en geen "dynamische" informatie verkregen, d.w.z. het wordt wel duidelijk dat een cel zich in een bepaalde fase van de celcyclus bevindt, maar niet hoe snel deze fase doorlopen wordt.

Een andere mogelijkheid om niet-tumorcellen uit te sluiten bij proliferatie-metingen is gebruik te maken van een extra parameter bij flowcytometrie, bijvoorbeeld cytokeratine, een eiwit dat specifiek is voor epitheliale (kanker)cellen, maar dat niet voorkomt in bloedcellen of bindweefselcellen.

De hoofdstukken 6 en 7 behandelen de tegenhanger van celproliferatie, nl. het proces van celdood. Op basis van de eerder genoemde observatie van ongelabelde S-fase cellen in tumorweefsel is een reeks experimenten uitgevoerd op longtumorcellen, om de origine en het gedrag van deze ongelabelde S-fase cellen te onderzoeken. Wanneer tumorcellen onvoldoende voedingsstoffen aangeboden krijgen stoppen ze met delen in de fase van de celcyclus waar ze zich op dat moment bevinden. Cellen die in S-fase zijn synthetiseren dan geen DNA meer en bouwen geen BrdU meer in, resulterend in ongelabelde S-fase cellen. Deze cellen bleken niet meer in staat te zijn hun delingsactiviteit te hervatten bij voldoende voedseltoevoer en verdwenen uit de populatie tumorcellen, waarschijnlijk ten gevolge van celdood.

Celdood voltrekt zich via twee verschillende processen, nl. apoptose en necrose. Er zijn aanwijzingen dat apoptose een belangrijke factor is bij tumorgroei. De methoden om een apoptotische cel te identificeren en te onderscheiden van een necrotische cel zijn tot op heden omstreven en niet in elke situatie toepasbaar. Aan de hand van

essentiële kenmerken van apoptotische cellen, zoals veranderingen in het cel- en kernskelet en fragmentatie van het DNA, werd een methode ontwikkeld waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen apoptotische, necrotische en vitale cellen.

Tumorgroei is het netto resultaat van celproliferatie en celdood. Een snelle groei van de tumor wordt meestal toegeschreven aan een hoge proliferatiesnelheid. Over het algemeen wordt aangenomen dat de werking van een antikanker-therapie wordt bepaald door de mate waarin de proliferatie wordt geremd. Onze resultaten omtrent longkanker en de resultaten van andere recente studies tonen aan dat ook de mate van celverlies een bepalende factor blijkt te zijn voor de groei van een tumor, terwijl de gevoeligheid van kankercellen voor chemotherapie in elk geval gedeeltelijk samenhangt met hun "apoptose-gevoeligheid". Kwantificering van proliferatie en apoptose zal daarom in de toekomst belangrijk worden bij het voorspellen van de groeicapaciteit en therapie-gevoeligheid van individuele tumoren.